

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS:

“PREVALENCIA DE LA LEUCOSIS BOVINA EN LAS COMUNIDADES CAMPESINAS DE CCOLCCA, ANDAMAYO Y LAURAMARCA DEL DISTRITO DE OCONGATE - CUSCO”

Presentada por la Bachiller en Ciencias Agrarias:

CHEYDDI LUZ FLORES CCONCHOY

Para optar al Título Profesional de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

Asesores:

MVZ. MSc. EDGAR ALBERTO VALDEZ GUTIÉRREZ

MVZ. MSc. JUAN CANCIO PINTO LEÓN

“PATROCINADOR: CONVENIO ARES-UNSAAC”

CUSCO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, por su amor y su infinita bondad, por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mi Madre Vilma, déjame decirte que te amo con todo mi corazón, y aunque las cosas puedan llegar a salir mal, con tu amor y anhelo soy capaz de lograr hasta lo imposible.

Dedico de manera especial a mi hermana Maybel, pues ella es el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación, en ella tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus virtudes infinitas y su gran corazón me llevan a admirarla cada día más.

A mis docentes, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro; por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

A mis amigos, que han estado conmigo a lo largo de mi vida y me han aceptado tal y como soy, por compartir sus conocimientos, alegrías, tristezas y brindarme su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a Dios, por haberme dado fuerza y valor para culminar esta etapa de mi vida.
- Al convenio ARES-UNSAAC por el financiamiento brindado para la ejecución de este proyecto de investigación.
- A mis asesores de tesis: MVZ. MSc. Edgar Alberto Valdez Gutiérrez y MVZ. MSc. Juan Cancio Pinto León, por su valiosa guía y asesoramiento a la realización de la misma.
- A mis maestros por compartir conmigo lo que saben y poder transferir sus conocimientos a mi vida.
- A mi hermana de corazón, Yamilet que ha llegado a mi vida como una mano derecha, te agradezco por tus consejos, paciencia y toda la ayuda que me brindaste para concluir satisfactoriamente con este trabajo.
- A Fiorela Guzmán y Milagros Centeno, por su gran apoyo y orientación en la realización de este trabajo.
- A todos los que forman parte del laboratorio de Sanidad Animal “M.V. Atilio Pacheco Pacheco” de la escuela profesional de Zootecnia.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

¡Gracias a ustedes!

ÍNDICE DE CONTENIDO

PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	3
1 CAPÍTULO I.....	4
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	4
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 Objetivo General	4
1.1.2 Objetivos Específicos	4
1.2 JUSTIFICACIÓN	5
2 CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
2.1.1 BASES TEÓRICAS	11
2.1.1.1 Leucosis Bovina	11
2.1.1.1.1 Etiología.....	11
2.1.1.1.2 Manifestaciones Clínicas	11
2.1.1.1.3 Lesiones	14
2.1.1.1.4 Transmisión	18
2.1.1.1.5 Diagnóstico	20
2.1.1.1.6 Anticuerpo	21
2.1.1.1.7 Afinidad del Anticuerpo	21
2.1.1.1.8 Especificidad del Anticuerpo	21
2.1.1.1.9 Antígeno	21
2.1.1.1.10 Reacción antígeno-anticuerpo	22
2.1.1.1.11 PRUEBA DE ELISA	22
2.1.1.1.11.1 Definición	22
2.1.1.1.11.2 ELISA Indirecta.....	23
2.1.1.1.12 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).....	24
2.1.1.1.13 Prevalencia	25

3	CAPÍTULO III	27
	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	27
3.1	TIPO DE ESTUDIO	27
3.2	DISEÑO ESTADÍSTICO	27
3.3	DURACIÓN	27
3.4	ÁMBITO DE ESTUDIO	27
3.4.1	Ubicación política	28
3.4.2	Ubicación geográfica	29
3.4.3	Límites	29
3.4.4	Datos climáticos	29
3.4.5	Vías de comunicación	29
3.4.6	Servicios de transporte	30
3.4.7	Características físico- ambientales	30
3.5	MATERIALES DE ESTUDIO	33
3.5.1	Población	33
3.5.2	Tamaño de muestra	33
3.5.3	De las muestras	34
3.5.3.1	Materiales para la toma de muestra	35
3.5.3.2	Materiales y equipos para la obtención del suero	35
3.5.3.3	Materiales y equipos de laboratorio	35
3.5.3.3.1	Equipos e instrumentos (Método de Elisa Indirecta)	35
3.5.3.3.1.1	Materiales para el procesamiento de muestras	36
3.5.3.3.1.2	Reactivos para el análisis de la LEB en el laboratorio	36
3.5.3.3.2	Equipos e instrumentos (Método de PCR-TR)	37
3.5.3.3.2.1	Materiales para el Procesamiento de Muestras	37
3.5.3.3.2.2	Reactivos para la extracción del RNA del Virus de la Leucosis Bovina	38
3.5.3.3.2.3	Reactivos para la identificación del Virus de la Leucosis Bovina	38

3.6 METODOLOGÍA.....	39
3.6.1 Toma de muestras.....	39
3.6.2 Obtención del suero.....	40
3.6.3 Metodología de laboratorio.	40
3.6.3.1.1 Método de Elisa indirecta para la Leucosis Bovina.....	42
3.6.3.1.1.1 Descripción y principios de la prueba (según el kit de laboratorio IDEXX).....	42
3.6.3.1.1.2 Preparación de reactivos.....	42
3.6.3.1.1.3 Protocolo del ensayo (Leucosis bovina).....	43
3.6.3.1.1.3.1 Metodología de ELISA Indirecta para Leucosis Bovina:	45
3.6.3.1.1.4 Validación de la prueba de la Leucosis Bovina	46
3.6.3.1.1.5 Prevalencia.....	47
3.6.3.1.1.6 Intervalo de Confianza	48
3.6.3.1.2 Método PCR en Tiempo Real para la Leucosis Bovina	48
3.6.3.1.2.1 Descripción y principios de la prueba.....	48
3.6.3.1.2.2 Extracción del Material Genético.....	49
3.6.3.1.2.2.1 Preparación de las Muestras y Reactivos.....	49
3.6.3.1.2.2.2 Procedimiento para la Extracción del Material Genético	50
3.6.3.1.2.2.3 Metodología de la Extracción del Material Genético:.....	54
3.6.3.1.2.3 Protocolo de detección de PCR- TR en un solo paso.	56
3.6.3.1.2.3.1 Protocolo de Reconstitución	56
3.6.3.1.2.3.2 Protocolo de Detección PCR- TR en un solo paso, para la ..	57
Identificación del VLB	57
3.6.3.1.2.4 Protocolo de amplificación de un paso.....	59
3.6.3.1.2.5 Interpretación de resultados.....	60
3.6.3.1.2.5.1 Procedimiento para la reconstitución de los componentes del kit para la identificación del LVB por el método de PCR Tiempo real. 61	
3.6.3.1.2.5.2 Metodología de detección PCR – TR en un solo paso, para la identificación del VLB.	62
4 CAPÍTULO IV.....	63

4.1 PREVALENCIA DE LA LEUCOSIS BOVINA EN VACUNOS DE LAS COMUNIDADES DE CCOLCCA, ANDAMAYO Y LAURAMARCA.	63
4.1.1 Determinación cualitativa del grado de infección en vacunos de las comunidades Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.	63
4.1.2 Determinación cuantitativa del grado de infección en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.	64
4.1.3 Prevalencia de LEB, en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.	72
4.1.4 Identificación del Virus de la Leucosis Bovina (VLB).....	76
5 CAPÍTULO V.....	82
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	82
5.1 CONCLUSIONES	82
5.2 RECOMENDACIONES.....	83
6 BIBLIOGRAFÍA	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de antecedentes para Leucosis Bovina.....	10
Tabla 2. Vías de comunicación a las Comunidades del Distrito.....	30
Tabla 3. Distribución del tamaño de muestra para cada comunidad.....	34
Tabla 4. Distribución del tamaño de muestra según categoría.....	34
Tabla 5. Distribución de la placa de ELISA indirecta para Leucosis Bovina de las comunidades Andamayo, Ccolcca y Lauramarca.....	43
Tabla 6. Interpretación de Muestra Individual.....	47
Tabla 7. Cantidad de Reactivo por Reacción para la Solución de Lisis Unión.....	49
Tabla 8. Cantidad de Reactivo por Reacción para la Solución de Perlas Magnéticas.....	49
Tabla 9. Combinación de reactivos por reacción.....	50
Tabla 10. Cantidad de Agua Libre de Nucleasas para la Reconstitución de los Componentes del Kit.....	56
Tabla 11. Cantidad de Buffer de Preparación de Plantilla para la Reconstitución de los Componentes del Kit.....	57
Tabla 12. Mezcla de Reacción para las Muestra de ARN.....	58
Tabla 13. Proceso de Amplificación.....	59
Tabla 14. Interpretación de Resultados.....	60
Tabla 15. Resultado cualitativo para Leucosis Bovina de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.....	64
Tabla 16. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Andamayo y Ccolcca (Placa I).....	65
Tabla 17. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Ccolcca (Placa II).....	65
Tabla 18. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Ccolcca y Lauramarca (Placa III).....	66
Tabla 19. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa IV).....	66
Tabla 20. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa V).....	67

Tabla 21. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Andamayo y Ccolcca (Placa I).....	68
Tabla 22. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Ccolcca (Placa II).....	68
Tabla 23. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Ccolcca y Lauramarca (Placa III).....	69
Tabla 24. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para LVB, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa IV).....	69
Tabla 25. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa V).....	70
Tabla 26. N° de muestras positivas y negativas a anticuerpos contra la LEB en las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.....	71
Tabla 27. N° de muestras positivas y negativas a anticuerpos contra la LEB de acuerdo a la edad en las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca...	71
Tabla 28. Prevalencia del LEB, en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.....	72
Tabla 29. Prevalencia de la LEB, según la edad en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.....	74
Tabla 30. Prevalencia de la LEB, según sexo en vacunos de la comunidad de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.....	75
Tabla 31. Valor del Ct (Ciclo umbral) de las muestras, control positivo, control negativo para el VLB.....	80

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de transmisión de Leucosis bovina	19
Figura 2 : Fase de la técnica Elisa indirecto.....	24
Figura 3: Mapa del distrito de Ocongate	28
Figura 5: Configuración de la placa experimental para Leucosis Bovina de las comunidades Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.	76

Figura 6: Configuración de los ciclos, tiempos y temperaturas para la amplificación del VLB por PCR en tiempo real.	77
Figura 7: Resultado de la amplificación de las muestras positivas al VLB.	78
Figura 8: Resultado de la muestra N° 1394 para la identificación del VLB perteneciente a la comunidad de Ccolcca.....	78
Figura 9: Resultado de la amplificación de las muestras positivas y control interno.	79

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Fotografía 1: Edema submandibular y pectoral; ingurgitación yugular	1
Fotografía 2 : Toma de muestras de sangre	39
Fotografía 3: Obtención de suero sanguíneo de los tubos vacutainer.	40
Fotografía 4: Alicotación del suero sanguíneo.	40
Fotografía 5: Resultados cualitativos para Leucosis Bovina de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.....	63
Fotografía 6: Laboratorio de Análisis Serológico Animal	112
Fotografía 7: Kit para el diagnóstico de Leucosis Bovina	113
Fotografía 8: Laboratorio de Biología molecular y celular	113
Fotografía 9: Reactivos para la extracción de material genético.....	114
Fotografía 10: Reactivos para la identificación del VLB.....	114
Fotografía 11: Materiales para la extracción del material genético y detección del VLB	115

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Flujograma de trabajo para la determinación de la LEB por el método de ELISA Indirecta	41
Gráfico 2: Flujograma de trabajo para la determinación de la LEB por el método de PCR en tiempo real	53

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cálculos para determinar el tamaño de muestra, comunidad de Andamayo.	89
Anexo 2. Cálculos para determinar el tamaño de muestra, comunidad de Ccolcca	90
Anexo 3. Cálculos para determinar el tamaño de muestra, comunidad de Lauramarca.	91
Anexo 4. Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para Leucosis Bovina, comunidad de Andamayo.	92
Anexo 5. Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para Leucosis Bovina, comunidad de Ccolcca.	94
Anexo 6. Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para Leucosis Bovina, comunidad de Lauramarca.	103
Anexo 7. Cálculos para determinar la prevalencia del LVB, en vacunos de la comunidad de Andamayo.	111
Anexo 8. Cálculos para determinar la prevalencia del LVB, en vacunos de la comunidad de Ccolcca.	111
Anexo 9. Cálculos para determinar la prevalencia del LVB, en vacunos de la comunidad de Lauramarca.	112
Anexo 10. Ficha de trabajo de campo.	116

GLOSARIO

- Ac :Anticuerpo
- Ag :Antígeno
- Ig :Inmunoglobulinas
- Ac :Conjugado
- TBM : Solución Substrato Tetrametil bencidina.
- DO :Densidad óptica
- μ l :Microlitros
- CN :Control negativo
- CP :Control positivo
- Ct : Ciclo umbral
- DNA : Acido desoxirribonucleico
- ELISA : Ensayo por Inmunoabsorción Ligada a la Enzima
- LU : Lisis unión
- PM : Perlas Magnéticas
- PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa
- LEB : Leucosis Enzootica Bovina
- VLB : Virus de la Leucosis Bovina

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las comunidades campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca pertenecientes al Distrito de Ocongate, Provincia de Quispicanchi, Departamento de Cusco. Teniendo como objetivos; determinar la prevalencia de la LEB en vacunos clasificados por cronometría dentaria y sexo; según método de ELISA Indirecta e identificar al virus de la Leucosis bovina por el método de PCR en tiempo real. Con un tamaño de muestra de 428 bovinos mayores a los 6 meses de edad, de las cuales, 205 fueron de Ccolcca, 55 de Andamayo y 168 de Lauramarca; las mismas que fueron analizadas en el laboratorio de Salud Animal de la Escuela Profesional de Zootecnia- UNSAAC.

Por el método de ELISA indirecta, los resultados evidenciaron una prevalencia de LEB del $2.34 \pm 0.14\%$ (10/428). De acuerdo al factor edad, las prevalencias fueron del $3.07 \pm 0.29\%$ (4/130), 0.00% (0/29), 0.00% (0/44), $3.03 \pm 0.58\%$ (1/33) y $2.60 \pm 0.22\%$ (5/192), en vacunos DL, 2D, 4D, 6D y BLL respectivamente. Siendo los vacunos DL y 6D los que tienen mayor probabilidad de poseer el virus. En cuanto al sexo $2.12 \pm 0.15\%$ (8/376) para hembras y $3.84 \pm 0.52\%$ (2/52) para machos, siendo las hembras más susceptibles. Al analizar 418 muestras de suero sanguíneo que resultaron negativas a la prueba de ELISA indirecta, se sometió a la prueba de RT-PCR, el cual identificó seis muestras positivas confirmándose la presencia del VLB, lo que sugiere la existencia de animales inmunotolerantes o con baja respuesta inmunológica al VLB. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la presencia del virus de la Leucosis Bovina en las comunidades en estudio, confirmándose la importancia de implementar programas de vigilancia epidemiológica.

INTRODUCCIÓN

En el distrito de Ocongate una de las principales actividades es la ganadería, dentro de la cual los bovinos constituyen una fuente importante de ingreso económico, para las 2774 familias dedicadas a la ganadería. La población bovina en la región del Cusco es de 423 941 cabezas de bovinos (CENAGRO, 2012).

Existen en la producción animal ciertas enfermedades o agentes infecciosos que, a pesar de estar presentes en los hatos, pasan casi inadvertidos para el hombre de campo. Esto se debe a que no provocan signos manifiestos o a que los mismos sólo aparecen en unos pocos animales dentro de la totalidad. Es así que estas enfermedades afectan negativamente la productividad del animal, siendo una de ellas la Leucosis Bovina (Rodríguez, 2006).

La LEB es una enfermedad altamente transmisible, que genera un importante impacto económico en la ganadería lechera. Las pérdidas económicas son debidas a muertes prematuras, reemplazo de animales enfermos y disminución de la producción láctea, así como por las restricciones de importación y exportación impuestas por algunos países (Benavides *et al.*, 2013).

En el Perú se dispone de escasa información sobre el estado actual de esta enfermedad, pero se sabe que es uno de los motivos de descarte en los establos lecheros de Lima (Orrego *et al.*, 2003).

Cabe destacar la necesidad de iniciar investigaciones relativas a la identificación y caracterización de las restricciones para la producción animal; estos estudios deben analizar simultáneamente el nivel de enfermedad, su impacto en la

producción y productividad y evaluar las diferentes tecnologías de control y métodos de extensión adecuados, de manera que esta información se traduzca en la creación de programas exitosos para la región (Romero *et al.*, 1999).

El presente trabajo de investigación se basa en la detección de anticuerpos y antígenos, en hatos lecheros de pequeños y medianos productores de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis para determinar la prevalencia de la LEB, mediante la técnica de ELISA Y PCR-RT, ya que estos métodos han demostrado una alta especificidad y mayor sensibilidad (96 - 99%), y menor porcentaje de falsos positivos, en comparación con otras pruebas que se realizan para el diagnóstico de la LEB como la prueba de Bendixen o de Göetze ,la inmunodifusión en gel de agar, radioinmunoensayo entre otras (Felmer *et al.*, 2006).

PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

La Leucosis bovina genera un gran impacto económico que incluye las pérdidas por casos clínicos de linfosarcoma, los efectos de la infección subclínica en la producción de leche y la segregación prematura de los animales, pero el mayor impacto lo tiene en las restricciones para el comercio internacional de bovinos seroreactores (Delgado *et al.*, 2009). Las pérdidas económicas son el resultado del descarte de canales en los mataderos, de animales a temprana edad o la muerte de individuos con linfoma, igualmente la barrera de exportación de animales vivos y sus productos (carne, leche, semen y embriones) y el incremento en gastos de medicinas y asistencias del veterinario. Por la afectación del sistema inmune y consecuente disminución de las defensas, hay mayor susceptibilidad a otras enfermedades de etiología infecciosa, como mastitis, diarrea y neumonía (De Souza, 2008).

Es así que; en las comunidades campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del distrito de Ocongate, se constató la introducción de animales de zonas con alta tasa de infección; asimismo, se observó algunos problemas reproductivos, digestivos y respiratorios que afectan la producción y productividad de los bovinos. Para las comunidades en estudio, la ganadería es su principal actividad, dentro de la cual los bovinos constituyen una fuente importante de ingreso económico, por ello que la significancia de su economía está dada por la pérdida de animales.

En este contexto el proyecto tiene como objeto determinar la prevalencia de la Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del distrito del distrito de Ocongate –Cusco.

CAPÍTULO I

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la prevalencia de Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del distrito del distrito de Ocongate – Cusco.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la prevalencia de Leucosis Bovina en vacunos clasificados por cronometría dentaria (Dientes de leche, 2 dientes, 4 dientes, 6 dientes y boca llena) y sexo; mediante el método de ELISA Indirecta.
- Identificar al Virus de la Leucosis Bovina por el método de PCR en tiempo real.

1.2 JUSTIFICACIÓN

En las comunidades campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca, distrito de Ocongate, no se efectuaron estudios sistemáticos que permitan conocer a la Leucosis Bovina (LEB), por lo tanto es importante lograr conocimientos sobre la presencia de esta enfermedad en estas zonas ganaderas, tomando en consideración el fácil contagio de la Leucosis Bovina en los animales, la cual se ve facilitada por el hacinamiento que favorece el contacto físico y la transmisión del virus lo cual puede ser de forma horizontal, ya sea directa (animal infectado a animal sano, ingesta de leche); así mismo de forma indirecta que engloba todas las prácticas de manejo que se realicen sin respetar las medidas higiénicas, son las vías más importantes de transmisión. También puede ser de forma vertical durante la gestación o parto (Castelli *et al.*,2001). Este virus tiene prevalencias mayores de 50-60%, cabe mencionar que puede llegar a infectar a un elevado porcentaje de los animales del hato, pero solo un bajo número de estos presentan síntomas clínicos de la enfermedad caracterizada por la presencia de tumores (linfosarcomas) siendo esta forma irremediablemente mortal (Gatti, 2007). Es así que de continuar con el inadecuado manejo y control se obtendrá al final grandes pérdidas económicas para el ganadero. En este proyecto se determinará la prevalencia de la Leucosis bovina en las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca, cuyo resultado permitirá la toma de decisiones inmediatas lo cual se traduce en la creación de programas exitosos para la prevención y control de esta enfermedad en el distrito de Ocongate. Además, a nivel general, el conocimiento de los resultados será útil, para contribuir con la sanidad de la ganadería lechera, no solo a nivel distrital, sino también a nivel regional.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Un estudio señala la seroprevalencia del virus de la Leucosis bovina (VLB) evaluada en 261 rebaños lecheros de 8 áreas diferentes del valle de Arequipa en el sur de Perú. Un total de 410 muestras de sangre se testearon para anticuerpos contra LEB, utilizando la prueba ELISA indirecta, la seroprevalencia encontrada fue 12,8% (52/410), con el 14,6% (38/261) de los rebaños infectados. La seroprevalencia fue mayor en los rebaños más grandes, sugiriendo que las prácticas de manejo contribuyen para aumentar el riesgo de transmisión viral. La seroprevalencia general de LEB es baja, por lo que la erradicación de esta enfermedad en el valle de Arequipa es factible (Flores & Rivera, 2000).

Según estudios realizados en Lima, Se seleccionaron animales con más de 6 meses de edad (n=55) para evitar los anticuerpos calostrales, y se realizó la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el VLB, empleando un kit comercial (IDEXX Leukosis Serum X2 Ab Test), el cual detecta anticuerpos contra el antígeno de superficie gp51. En el examen clínico solo se encontró una vaca con los ganglios linfáticos incrementados de tamaño; sin embargo, el 91% de los animales presentaron anticuerpos contra el VLB. Así mismo, todos los animales mayores de 5 años y el 97% de los animales entre 2 y 5 fueron positivos al VLB. La prevalencia real, luego de corregir la prevalencia aparente por la sensibilidad y especificada de la prueba, resultó de 95,7%. La alta prevalencia de VLB del establo se puede deber al alto grado de manipulación que reciben los animales por parte de los estudiantes y a la

omisión de algunas prácticas de bioseguridad, como el uso de las mismas agujas en múltiples animales (Sandoval *et al.*, 2015).

Según un estudio en Moquegua, se observa de 110 sueros sanguíneos analizados mediante la técnica diagnóstica de ELISA indirecta, 25 corresponden a bovinos menores de 1 año, solo se encontró 1 muestra seropositiva a VLB lo que representa $0,91 \pm 0,02\%$ de prevalencia; para los animales de 1 a 2 años se analizaron 19 sueros sanguíneos, 4 indicaron seropositividad al VLB, equivalente a $3,64 \pm 0,04 \%$ de prevalencia, y para animales mayores de 2 años se analizaron 66 sueros sanguíneos, resultando 17 de ellos seropositivos representando una prevalencia de $15,45 \pm 0,01 \%$ de VLB. Esto se atribuye a que en el Valle Viejo de Moquegua el VLB se está diseminando por prácticas inadecuadas de manejo (transmisión horizontal) en especial en los animales que ya ingresaron a una etapa reproductiva, por lo tanto también a una etapa productiva, en la cual hay un mayor estrés de estos animales y mayor predisposición al VLB, Según el sexo se observa que de los 110 sueros sanguíneos 88 corresponden a hembras de los cuales 20 resultaron seropositivos lo que representa el $18,18 \pm 0,01\%$ de prevalencia del VLB y 22 machos resultaron seropositivos 2 sueros sanguíneos representando al $82 \pm 0,03\%$ de prevalencia del VLB (Barrera, 2010).

(Fabián, 2013) Realiza un estudio en Trujillo, en 240 animales examinados por medio de prueba ELISA indirecta, de los cuales 9 presentan linfomatosis bovina, la seroprevalencia encontrada fue de 3,8%, se detalla que la linfomatosis bovina se presenta en su totalidad en la raza Holstein (100%), en cuanto al sexo se observó que el mayor porcentaje fueron hembras (88,9%),

respecto a la procedencia el 77,8% fue de Trujillo y la edad promedio fue 4,89 años con una desviación estándar de 1,75.

En un estudio realizado en Huánuco, en el estudio se utilizaron 207 muestras de suero sanguíneo provenientes de animales de las razas Holstein, Brown Swiss y cruces (Holstein x Brown Swiss, Holstein x Cebú y Brown Swiss x Cebú), de 1 a 10 años de edad evaluadas mediante la prueba de ELISA Indirecta. Los resultados obtenidos de la seroprevalencia de Leucosis bovina en la provincia de Leoncio Prado fue $12\pm 4.4\%$. Presentando los distritos de Rupa Rupa y Daniel Alomías Robles prevalencias altas ($33\pm 31\%$ y $29\pm 33\%$ respectivamente). Asimismo, los cruces de Holstein x Brown Swiss, resultaron con mayor porcentaje de prevalencia $29\pm 24\%$ y el factor de riesgo para la presencia del virus aumenta a partir de los 5 años de edad de los bovinos en el hato, ($P < 0,05$) (Modena, 2007).

El estudio realizado en Colombia, la PCR identificó un total de 219 vacas positivas al VLB de las 500 muestreadas, equivalente al 44 % de infección en el departamento de Antioquía (Úsuga *et al.*, 2015).

Se realizó un estudio sobre la seroprevalencia de la Leucosis Enzoótica bovina (LEB) en 360 bovinos lecheros, representativos de los municipios Pedraza y Barinas del estado Barinas, Venezuela. Se recolectaron muestras de sangre, para la detección de anticuerpos y la proporción de linfocitos, lo cual se hizo mediante la prueba de ELISA y por conteo de linfocitos, respectivamente, relacionándose el porcentaje de animales seropositivos con el hallazgo de signos, tumefacciones en los ganglios y valores linfocíticos. De un total de 331 sueros de animales hembras y 29 machos, 201 (60,73%) y 18 (62,07%),

respectivamente, resultaron con Acs específicos contra el VLB, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la ocurrencia de infección por el VLB. En cuanto a la variable edad, en el grupo etario de 1 a 4 años, 47 de 97 (21,56%), resultaron seropositivos, mientras que el grupo ≥ 5 años, 172 de 262 (65,65%) fueron positivos a la prueba serológica, mostrando diferencias significativas ($P=0,0030$). Este resultado indica que existe asociación entre la edad de los bovinos y la positividad a la infección, es decir, que a mayor edad mayor es la probabilidad de que los animales resulten seropositivos, probablemente debido a que han tenido mayor exposición al virus (Nava *et al.*, 2011).

El objetivo de esta investigación fue determinar la seroprevalencia de LEB en animales menores de dos años en las provincias de Pichincha, Manabí y Chimborazo, las cuales reportan gran producción lechera en Ecuador. Se analizaron 3 307 muestras de suero sanguíneo bovino mediante la técnica serológica ELISA indirecto, de las cuales 480 fueron de Pichincha, 2 348 de Manabí y 479 de Chimborazo. Pichincha presentó una seroprevalencia de 8.13 %, con el mayor porcentaje de animales enfermos en la principal cuenca lechera del país, el cantón Mejía. En Manabí se observó 0.89 % de seroprevalencia de LEB y en Chimborazo 3.13 %. Utilizando chi cuadrado para determinar la relación entre las variables evaluadas y la aparición de LEB, se reveló que no existe asociación, mostrando un resultado de 105.14, 7.48, 140.91 y 38.87 frente a valores de p de 11.34 (clima), 9.21 (altitud), 18.48 (edad) y 9.21 (propósito del ganado). Sin embargo, se observó mayor tendencia a enfermar en clima templado y mayor altitud, lo que pudo explicarse

por la similitud en las prácticas de manejo y la explotación tipo intensivo (Vásconez *et al.*, 2017).

Tabla 1. Resumen de antecedentes para Leucosis Bovina

Autor, Año y Lugar	N° de Animales	Muestra	Prueba	Prevalencia
Flores A. & Rivera G., 2000 Arequipa	410	Suero sanguíneo	Elisa Indirecta	12,8%(52/410)
Sandoval <i>et al.</i>,2015 Lima	55	Suero sanguíneo	Elisa Indirecta	92,7%(51/55)
Barrera, 2010 Moquegua	110	Suero sanguíneo	Elisa Indirecta	0,91± 0,04 < 1 año. 3,64 ± 0,09, 1 - 2 años. 13,45 ± 0,01 % >2 años
Fabián, 2013. Trujillo	240	Suero sanguíneo	Elisa Indirecta	3,8%
Modena, 2007 Huánuco	207	Suero sanguíneo	Elisa Indirecta	12±4,4%
Úsuga <i>et al.</i>, 2015 Colombia	500	Suero sanguíneo	PCR anidada	44%
Nava <i>et al.</i>, 2011. Venezuela	360	Suero sanguíneo	Elisa indirecta	21,56 % 1 – 4 años 65,65 % ≥5 años
Vásconez <i>et al.</i>, 2017 Ecuador	3307	Suero sanguíneo	Elisa indirecta	8,13% P. Pinincha 0,89% P. Manabi 3,13% P. Chimborazo

Fuente: Elaboración propia a partir de varios autores.

2.1.1 BASES TEÓRICAS

2.1.1.1 Leucosis Bovina

La Leucosis bovina (LB) o Leucosis bovina Enzoótica (LEB) es una enfermedad infecciosa, crónica, viral, contagiosa, que afecta naturalmente al ganado bovino. La mayoría de las infecciones son subclínicas, pero dentro de los tres años posteriores al contagio alrededor del 30% de los afectados desarrollará linfocitosis persistente, y una proporción menor linfosarcomas en diversos órganos. Esta enfermedad tiene muchas sinonimias como Leucosis linfoide, leucemia bovina, linfosarcoma, linfoma maligno, Leucosis Enzoótica o Leucosis endémica (Baruta *et al.*, 2005).

2.1.1.1.1 Etiología

El agente etiológico de la LEB es un virus ARN, el virus de la leucemia bovina (VLB). El VLB es un retrovirus exógeno, subfamilia Orthoretrovirinae, género delta retrovirus, que afecta a células de la línea linfoide, linfocitos B, aunque también posee capacidad de infectar otras células como los linfocitos T y monocitos. Como todo retrovirus posee reverso transcriptasa responsable de la síntesis de una copia de ADN a partir de ARN viral. Este nuevo ADN o Pro virus se conserva en el interior de las células del hospedador, propiedad que le da las características de la infección (integración de la información viral en las células del organismo). (Benavides *et al.*, 2013)

2.1.1.1.2 Manifestaciones Clínicas

La VLB se caracteriza por múltiples casos de linfosarcoma multicéntrico en bovinos adultos, que son tumores caracterizados por cúmulos de linfocitos neoplásicos que desarrollan rápidamente en varios lugares del cuerpo y por tanto con síntomas clínicos variables. El periodo habitual de incubación es de

cuatro a cinco años. La linfocitosis persistente sin síntomas clínicos aparece antes, raramente antes de los dos años de edad. Muchas vacas permanecen en el estado preclínico de la enfermedad durante años, con frecuencia durante toda la vida productiva, sin ninguna reducción aparente en su rendimiento, aunque los animales pueden infectarse con LVB a cualquier edad, los tumores (linfosarcoma) se observan típicamente en animales de más de tres años. (Grajales, 2011)

Normalmente las infecciones son subclínicas; solamente el 30-70% del ganado infectado desarrolla una linfocitosis persistente, y el 0,1-10% desarrolla tumores. Los síntomas dependen del lugar en que aparecen los tumores y pueden incluir desarreglos digestivos, inapetencia, pérdida de peso, debilidad general y, a veces, manifestaciones neurológicas. Los ganglios linfáticos superficiales pueden verse inflamados y se pueden palpar bajo la piel o por examen rectal. Los órganos implicados con más frecuencia son la cuarta cavidad del rumen, la aurícula derecha del corazón, el bazo, el intestino, el hígado, el riñón, la tercera cavidad del rumen, los pulmones y el útero. La susceptibilidad del ganado a una linfocitosis persistente está determinada genéticamente, y quizá también el desarrollo del propio tumor. (Grajales, 2011)

En el 5-10% de los casos clínicos el curso es hiperagudo; a menudo los animales afectados mueren súbitamente sin previa muestra de la enfermedad. La afectación de las glándulas adrenales, la rotura de una ulcera abomasal, o un bazo afectado seguido de una hemorragia interna aguda son causas conocidas; en la mayoría de los casos clínicos el curso es de subagudo (hasta siete días) a crónico (varios meses) y se inicia con una pérdida inexplicable de condición corporal (emaciación), anorexia, palidez y debilidad muscular. La

producción puede caer drásticamente en vacas lecheras. La frecuencia cardiaca no se ve aumentada salvo que el miocardio este afectado con tejido infiltrativo y la temperatura es normal excepto cuando el crecimiento tumoral es acelerado. Una vez que los síntomas clínicos y el desarrollo del tumor sean detectables la muerte sobreviene dos a tres semanas después. (Grajales, 2011)

La exoftalmia por degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, es bastante específico como signo de la enfermedad. La presencia de deformaciones o masa tumorales subcutáneas en varias partes del cuerpo, también es indicativo de la enfermedad. Junto a los ganglios linfáticos, los tejidos afectados con mayor frecuencia incluyen el abomaso, corazón, bazo, riñones, útero, meninges y tejido linfático retrobulbar. Los tonos cardiacos están frecuentemente apagados, y son obvias otras alteraciones cardiacas. La linfomatosis neural puede conducir al comienzo gradual de parálisis posterior durante varias semanas. (Grajales, 2011)

Las formas de los terneros, tímica y cutánea son denominadas Leucosis bovina esporádica. Los síntomas clínicos del linfosarcoma del ternero incluyen pérdida gradual de peso, aumento generalizado y súbito del tamaño de los nódulos linfáticos y debilidad; fiebre, taquicardia y parresia posterior son síntomas menos frecuentes. La muerte se produce entre los dos a ocho meses. Igualmente síntomas como presión en órganos internos por las masas tumorales e insuficiencia cardiaca. Asimismo se ha descrito necrosis del hueso y medula ósea, con debilidad e inactividad, ataxia posterior, aumento de nódulos linfáticos, cojeras y disnea asociadas. (Grajales, 2011)

El linfosarcoma tímico es un hallazgo frecuente en animales de 1-2 años de edad y se caracteriza por aumento masivo del timo en el área de la papada y lesiones en la medula ósea y nódulos linfáticos. También son frecuentes la congestión de la vena yugular y el edema marcado de la papada y la región submandibular, puede aparecer un timpanismo moderado a causa de la incapacidad para eructar debido a compresión esofágica por ganglios mediastínicos de la cavidad torácica, las masas tímicas normalmente no son palpables. (Grajales, 2011)

Los síntomas se aprecian mayoritariamente después de los dos años de edad y el periodo de mayor frecuencia es entre los cinco y ocho años. La mayor proporción de los síntomas son inespecíficos y variables, puesto que van a responder a la ubicación de las formaciones neoplásicas y según el grado de afectación de los órganos. Se ha descrito anemia, emaciación e infertilidad. También se han reportado momificaciones por tumoraciones en las paredes del útero y cuernos uterinos.(Grajales, 2011)

2.1.1.1.3 Lesiones

Las lesiones más constantes son tumores en los ganglios linfáticos, los más frecuentemente afectados son los iliacos (65 a 83%), intratorácicos (62 a 74%), mesentéricos (66%) y los superficiales (pre escapulares, pre crurales y de la región cervical) (41 a 62%). Estos se muestran a menudo lisos o con nódulos, sin adherencia a tejidos circundantes, consistencia blanda y edematosa o firme turgente y friable. (Grajales, 2011)

En algunos casos puede observarse hemorragia o pequeños focos de necrosis de apariencia seca y color amarillento. Cuando está afectada la

médula ósea (aunque no se establezca en los registros, quizás debido a que los huesos generalmente no se examinan con regularidad) aparece un tejido blanco-gris o blanco remplazando el color rojo que se observa en la médula hemopoyética normal. (Grajales, 2011)

En neonatos y animales jóvenes, los sitios más comunes son los riñones, timo, hígado, bazo y ganglios periféricos e internos; en los adultos el corazón abomaso y medula espinal están a menudo afectados. En el corazón, las masas tumorales invaden particularmente el atrio derecho, aunque se pueden encontrar por todo el miocardio y se extienden al pericardio. (Grajales, 2011)

El bazo se afecta en un 10 a un 50% de los casos, pudiendo presentar un aumento moderado de tamaño o una esplenomegalia tumoral; la superficie de corte aparece seca y se observan nódulos blanquecinos diseminados por todo el parénquima. El corazón, a pesar de no ser un órgano linfoide, presenta una frecuencia de afectación bastante alta, aparecen nódulos de variado tamaño o áreas infiltradas en forma difusa de color blanquecino con límites mal definidos en el espesor del miocardio, visibles a través del epicardio y endocardio. El músculo esquelético se puede ver afectado de igual forma, pero se reporta con menos frecuencia. (Grajales, 2011)

El útero aparece con sus paredes engrosadas por la infiltración de tejido de aspecto lardáceo de color blanco-gris o mate. El epitelio y las cubiertas fetales no son regularmente afectados. El abomaso aparece infiltrado por el tejido tumoral produciéndose el aumento del grosor de la pared, aunque también puede presentar úlceras. En el intestino puede presentar lesiones

semejantes a las del abomaso, pero la tendencia a la presentación de úlceras es mayor en la mucosa intestinal. (Grajales, 2011)

En los riñones, las lesiones aparecen en 50% de los casos y pueden tener carácter infiltrativo, produciéndose hemorragias visibles en la superficie del órgano, o pueden presentarse nódulos que resultan en atrofia del parénquima renal. La vejiga puede presentar su pared engrosada y su mucosa ulcerada debido a la infiltración tumoral. El tejido retro-ocular puede afectarse y puede provocar con su crecimiento la protrusión del globo ocular o exoftalmos. Se ha observado la infiltración tumoral de la córnea y también la presencia del tumor en la cámara anterior del ojo, el hígado presenta aumento de tamaño y coloración pálida difusa. Las lesiones tumorales en el pulmón son raras pero puede presentarse de forma infiltrativa difusa y nodular. Se nota la presencia de masas tumorales en el tejido subcutáneo de la región abdominal. (Grajales, 2011)

Linfosarcoma Multicéntrico en Adultos: La mayoría de los animales cursan con signos inespecíficos durante una semana o varios meses: pérdida de peso, anorexia, disminución de la producción, anemia, palidez, debilidad, marcha tambaleante, dificultad para incorporarse y algunos pueden presentar fiebre cuando el tumor crece rápidamente. Cuando el animal presenta estos signos clínicos, la muerte se produce generalmente después de dos ó tres semanas. (Grajales, 2011)

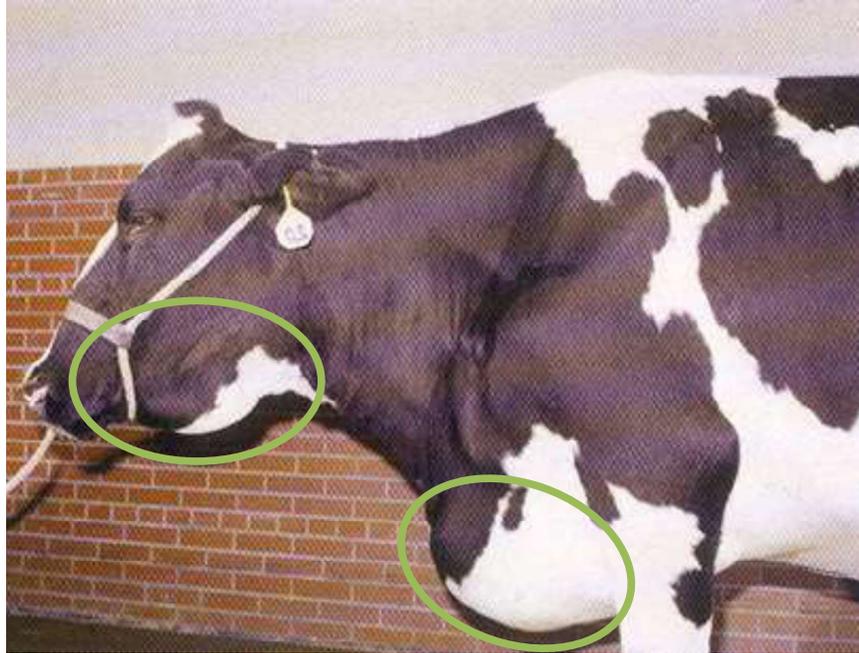
Linfadenectasia Superficial: En la mayoría de los casos el aumento del tamaño de los ganglios linfáticos superficiales es un signo inicial. Aumentan de tamaño los ganglios palpables rectalmente, que a menudo se extienden al

peritoneo y a las vísceras pelvianas, los hemolinfáticos del periné y los flancos, los de la cabeza o la sínfisis mandibular. En muchos animales todos los ganglios están afectados, y en muy raras ocasiones la superficie corporal está cubierta con masas subcutáneas múltiples, de 5 a 10 cm de diámetro. (Grajales, 2011)

Linfosarcoma Abomasal: La afectación de la pared del abomaso causa: apetito voraz, diarrea acuosa y persistente y melena debido a una úlcera hemorrágica que puede romperse y convertirse en un caso hiperagudo. (Grajales, 2011)

Linfosarcoma Cardíaco: La afectación de la pared del ventrículo derecho causa insuficiencia cardiaca congestiva derecha, y se perciben los tonos cardíacos amortiguados por el hidropericardio, disnea por hidrotórax, congestión venosa yugular, edema en el pecho y el espacio intermandibular, taquicardia y arritmia, soplo sistólico asociado con un aumento exagerado del pulso yugular, aumento del tamaño del hígado y diarrea debida a la hipertensión portal. (Grajales, 2011)

Afección del Sistema Nervioso: Se manifiesta con la aparición gradual de parálisis en las extremidades pelvianas durante varias semanas y, a veces, en una extremidad más que en la otra. Comienza por la flexión del menudillo, marcha tambaleante y dificultad para incorporarse; y por último postración. (Grajales, 2011)



Fotografía 1: Edema submandibular y pectoral; ingurgitación yugular

2.1.1.1.4 Transmisión

Los bovinos son la única especie que se infecta de forma natural, la enfermedad no se propaga con gran rapidez. Principalmente horizontal, ya sea directa (animal infectado a animal sano, ingesta de leche), El hombre juega un papel importante en este proceso. La ejecución inadecuada de ciertas prácticas de manejo de la granja facilita el contagio del virus dentro de la misma. Esto sucede, por ejemplo, al compartir el uso entre varios animales de los mismos elementos contaminados con sangre infectada, entre ellos pueden mencionarse a las agujas hipodérmicas, jeringas, instrumental de cirugía, guantes descornadores, elementos para realizar el tatuado o caravaneado También ciertos insectos que se alimentan de sangre, como mosquitos, tábanos o garrapatas, pueden participar como vectores en la transmisión de la

enfermedad. A su vez existe transmisión vertical durante la gestación o parto. (Quiroz, 2007)

Los bovinos infectados son el reservorio del virus, por lo tanto todos los líquidos corporales son potencialmente infectantes. El contagio prenatal, que se produce durante la gestación, se observa en un porcentaje elevado de terneros positivos (3 a 20%). Los animales portadores asintomáticos son las grandes fuentes de contagio en los rodeos, siendo ellos, en la forma horizontal, el contagio más importante y la que produce mayor número de nuevos infectados. La infección no se extiende de bovino a ovino cuando estos animales están mezclados para tacto rectal.(Quiroz, 2007)

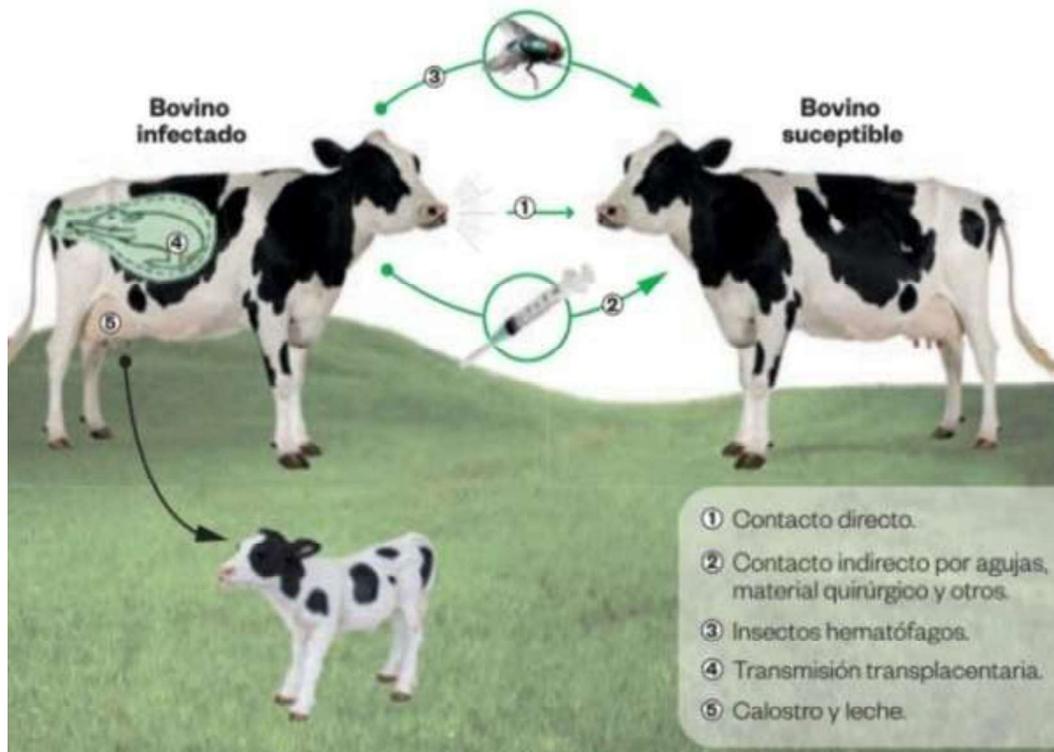


Figura 1: Mecanismos de transmisión de Leucosis bovina

2.1.1.1.5 Diagnóstico

Mientras que el diagnóstico de los bovinos con linfosarcoma es relativamente sencillo para el veterinario clínico, la detección de los animales con linfocitosis persistente y de los bovinos infectados sin signos clínicos requiere de la ayuda del laboratorio. Las técnicas para la detección de animales infectados pueden ser:

a) Detección de anticuerpos:

- Prueba de inmunodifusión en agar gel (IDA): es sencilla y la de uso más difundido para la detección de anticuerpos.
- Enzimo- Inmunoensayo (test de ELISA): tiene las mismas limitantes que la anterior cuando se usa en terneros. Pero tiene la ventaja de detectar la presencia de anticuerpos antes que IDA. Además, se puede realizar en forma automatizada y el resultado se obtiene dentro de las 24 horas. Para el diagnóstico de bovinos con linfocitosis persistente se debe hacer el recuento de glóbulos blancos y la fórmula leucocitaria relativa en la sangre de los animales con serología positiva. Aquellos que presenten un marcado incremento en el número de linfocitos, indicaría mayor capacidad para dispersar la enfermedad. Este sería un método complementario de la detección de anticuerpos para definir la eliminación de animales infectados. (Casas, 2014)

b) Detección del virus:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica permite detectar la presencia del ADN del virus en la sangre; con anterioridad a la detección de anticuerpos. Su alto costo y complejidad la restringe a ser utilizada en trabajos de investigación.(Casas, 2014)

2.1.1.1.6 Anticuerpo

Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) son moléculas glicoproteicas (90% polipéptidos, 10% carbohidratos) que tienen la capacidad de combinarse específicamente con un antígeno o un inmunogeno. (Vega, 2009)

2.1.1.1.7 Afinidad del Anticuerpo

La fuerza de unión entre un anticuerpo y un solo antígeno se denomina afinidad. Suma de todas las fuerzas atractivas y repulsivas entre un sitio de unión del anticuerpo (paratopo) y el correspondiente epitopo. Se define por una constante de equilibrio (K), según la ley de acción de masas. (Vega, 2009)

2.1.1.1.8 Especificidad del Anticuerpo

Cuando un anticuerpo solo puede reaccionar con un antígeno se dice que ese anticuerpo es específico.

2.1.1.1.9 Antígeno

Un antígeno es cualquier agente extraño que al entrar en el organismo desencadena la producción de anticuerpos específicos contra él. Es una molécula extraña reconocida por el sistema inmunitario, en concreto por anticuerpos preformados o por receptores específicos en linfocitos B o T. Tradicionalmente se aplica a los inmunogenos o moléculas que desencadenan la respuesta inmune. Los antígenos suelen ser moléculas grandes que se hallan formando parte de las estructuras superficiales de los microorganismos (cápsula o pared bacteriana, envoltura o cápside de los virus, etc.) o de las toxinas que éstos segregan en el medio interno (De loannes, 2007).

2.1.1.1.10 Reacción antígeno-anticuerpo

Tanto la respuesta humoral como la celular suponen el reconocimiento de determinadas estructuras químicas en la superficie de macromoléculas extrañas, los antígenos. Estas estructuras químicas del antígeno se denominan determinantes antigénicos la especificidad de la respuesta inmunitaria va dirigida especialmente a ellos. (De loannes, 2007)

Cuando se ponen en contacto un antígeno con el anticuerpo específico, reaccionan uniéndose mediante un enlace no covalente entre la zona específica de la inmunoglobulina y los determinantes antigénicos de la molécula de antígeno. La combinación del anticuerpo con el antígeno desencadena una serie de procesos capaces de neutralizar y eliminar a una sustancia extraña. Esta unión se realiza por medio de uniones intermoleculares entre el antígeno y la zona del anticuerpo y da lugar al complejo antígeno-anticuerpo según el modelo llave-cerradura.(De loannes, 2007)

2.1.1.1.11 PRUEBA DE ELISA

Ensayo de Inmuno absorción ligada a enzimas (Elisa)

2.1.1.1.11.1 Definición

Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista

o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. El principio de ELISA de basa en determinar si una proteína particular está presente en una muestra y con posibilidad de cuantificarla.(Cultek, 2006)

2.1.1.1.11.2 ELISA Indirecta.

Es un ensayo parecido al ELISA directo pero en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. En este caso se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, y es este último el que irá conjugado a una enzima. (Cultek, 2006)

Consta de las siguientes etapas:

El procedimiento simplificado sería el siguiente:

- El antígeno se inmoviliza sobre una placa
- Se añade un anticuerpo primario sin marcar que se une al antígeno de interés
- Se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario
- Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.



Figura 2 : Fase de la técnica Elisa indirecto.

2.1.1.1.12 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

Es una técnica para hacer muchas copias de una determinada región de ADN in vitro (en un tubo de ensayo en lugar de un organismo). La PCR ha sido utilizada para la detección temprana del VLB en animales menores de seis meses y evita reacciones de falso positivas, causadas por transferencia pasiva de inmunoglobulinas a través del calostro. Otra ventaja radica en la capacidad para detectar el virus en animales inmunotolerantes, la sensibilidad es 96% y la especificidad 45%, con respecto a la prueba de IGDA. Esto demuestra que la PCR es más sensible que las otras pruebas. (Panduro, 2000)

La PCR de transcripción inversa o RT-PCR, permite el uso de RNA como molde. Un paso adicional permite la detección y amplificación del RNA. El RNA se transcribe de forma inversa en DNA complementario (cDNA) utilizando una transcriptasa inversa. La calidad y pureza del RNA molde es esencial para el éxito de la RT-PCR. El primer paso de la RT-PCR es la síntesis de un híbrido DNA / RNA. La eficiencia de la reacción de la primera

cadena puede afectar al proceso de amplificación. A partir de aquí, se utiliza el procedimiento de PCR convencional para amplificar el cDNA. La posibilidad de revertir el RNA en cDNA por RT-PCR tiene muchas ventajas (Genesig, 2008).

Se aplica para la detección de VLB en animales individuales en las siguientes circunstancias:

- Terneros jóvenes con anticuerpos del calostro,
- Casos de tumor, para diferenciar entre linfoma esporádico e infeccioso,
- Tejido tumoral de casos sospechosos recogidos en mataderos,
- Nuevas infecciones, antes del desarrollo de anticuerpos contra el VLB,
- Casos de resultados débilmente positivos o inciertos en pruebas de tipo ELISA,
- Análisis sistemático de ganado en centros de prueba de reproducción (antes de la introducción en centros de inseminación artificial),
- Ganado empleado en la producción de vacunas, para comprobar que están exentos de LVB. (Panduro, 2000)

2.1.1.1.13 Prevalencia

La prevalencia cuantifica la proporción de individuos de una población que padecen una enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado. La prevalencia depende de la incidencia y de la duración de la enfermedad. Si la incidencia de una enfermedad es baja pero los afectados tienen la enfermedad durante un largo período de tiempo, la proporción de la población que tenga la enfermedad en un momento dado puede ser alta en relación con su incidencia. Inversamente, si la incidencia es alta y la duración es corta, ya sea porque se recuperan pronto o fallecen, la prevalencia puede

ser baja en relación a la incidencia de dicha patología. Por lo tanto, los cambios de prevalencia de un momento a otro pueden ser resultado de cambios en la incidencia, cambios en la duración de la enfermedad o ambos. (Moreno *et al.*, 2000)

La prevalencia (P) cuantifica la proporción de individuos de una población que padecen una enfermedad en un momento o periodo de tiempo determinado. (Fernández *et al.*, 2004.)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realiza con un enfoque descriptivo.

3.2 DISEÑO ESTADÍSTICO

Es descriptivo ya que traza lo que es; descripción, registro, análisis e interpretación de las condiciones existentes en la actualidad.

3.3 DURACIÓN

El periodo de duración del presente trabajo de investigación fue desde mayo del 2018 a febrero del 2019.

3.4 ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en vacunos de las Comunidades Campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del Distrito de Ocongate de la provincia de Quispicanchi, Cusco. En la primera etapa se hizo la toma de muestras y en la segunda etapa el procesamiento de muestras en el laboratorio del Área de Salud Animal-UNSAAC.

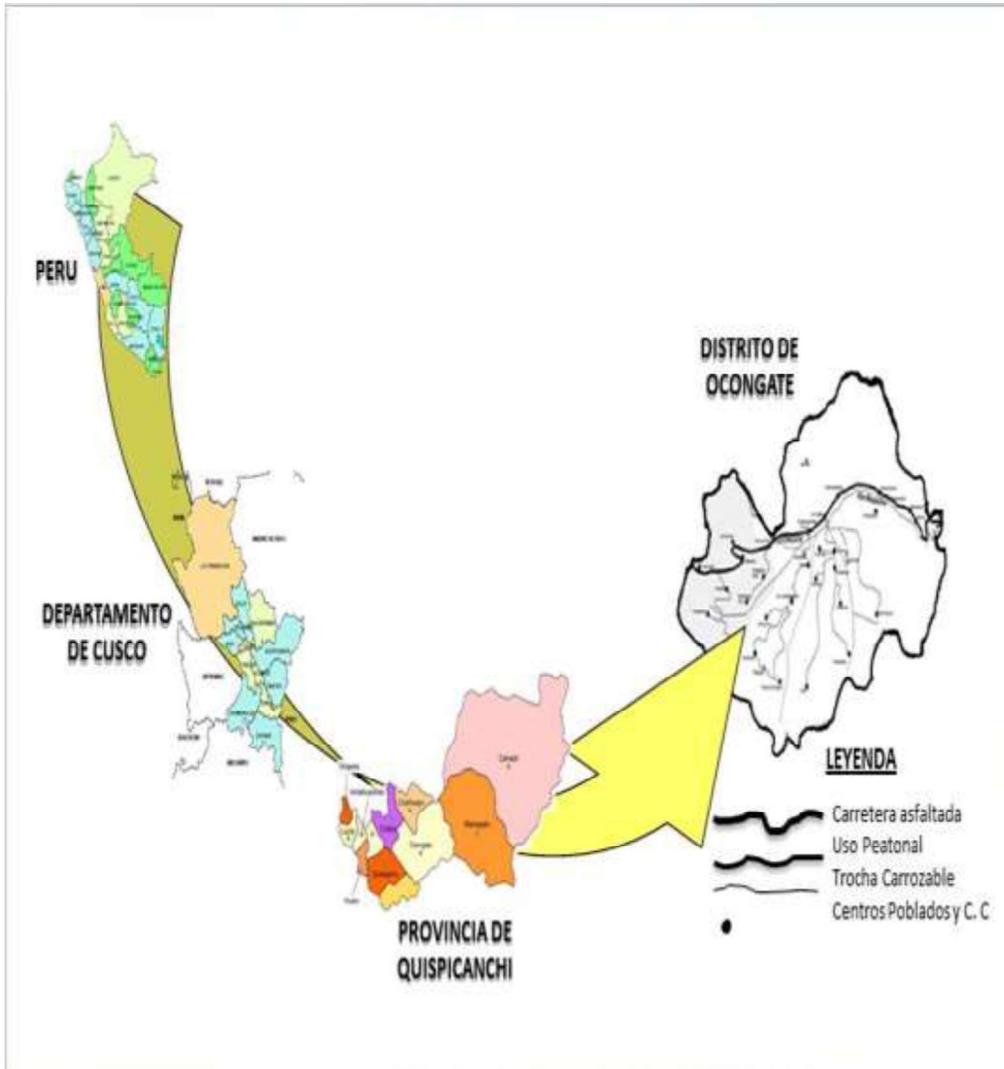


Figura 3: Mapa del distrito de Ocongate

3.4.1 Ubicación política

- Región : Cusco
- Departamento : Cusco
- Provincias : Quispicanchis.
- Distrito : Ocongate

3.4.2 Ubicación geográfica

- Latitud sur : 13°37'24"
- Longitud oeste : 71°23'07"
- Altitud : 3 540 m s. n. m.
- Superficie : 952,66 Km²

3.4.3 Límites

- Por el norte : Distrito de Ccarhuayo.
- Por el sur : Distrito de Pitumarca de la Provincia de Canchis.
- Por el este : Distrito de Marcapata.
- Por el oeste : Con los Distritos de Ccatca y Urcos.

Fuente: Municipalidad Distrital de Ocongate, 2007.

3.4.4 Datos climáticos

- Temperatura promedio anual : 2.2°C – 15.4°C
- Humedad relativa : 86.8%
- Velocidad del viento : 7.3 m/s
- Precipitación : 411.97 mm

Fuente: SENAMHI, 2007.

3.4.5 Vías de comunicación

En el Distrito de Ocongate la vía de comunicación más importante es la pista asfaltada de la interoceánica, también existen vías que interconectan con las comunidades y centros poblados, estas son trochas carrozables que en su mayoría se encuentran en regular estado de conservación. (Municipalidad Distrital de Ocongate, 2012)

En el siguiente cuadro, se pueden apreciar las tres Comunidades en estudio, sus vías de comunicación y estado de conservación.

Tabla 2: Vías de comunicación a las Comunidades del Distrito

Comunidad y/o Centro poblado	Trocha carrozable	
	Distancia de Ocongate a comunidades Long. Km.	Estado de Conservación
Ccolcca	6.5	Poco mantenimiento
Andamayo	14	Mal estado
Lauramarca	9	Poco mantenimiento

Fuente: Plan de desarrollo concertado Ocongate

3.4.6 Servicios de transporte

El servicio de transporte en el Distrito de Ocongate está conformado por empresas de transporte interprovincial e interdistrital, diariamente y en horario continuo, que permite la movilización de la población hacia las diferentes comunidades del Distrito, sin embargo estas prestan servicio hasta las 6.00 pm.

3.4.7 Características físico- ambientales

a) Geomorfología

El distrito de Ocongate posee características geomorfológicas diversas, con un relieve terrestre accidentado, con una variedad de pisos altitudinales. Los acontecimientos tectónicos ocurridos hace miles de años definieron su forma actual, pero las acciones cuaternarias son las que han desarrollado la mayor parte de configuración de la superficie actual del terreno, especialmente por la ocurrencia de tres periodos glaciales lo que tuvieron una incidencia notable en el modelo de más del 70% de la región.

La topografía dentro de la jurisdicción Distrital se divide en seis tipos de morfología: Región Ritti, Puna, Puna Colinosa, Suni, Zona de Transición y Quechua. (Municipalidad Distrital de Ocongate, 2012)

b) Recurso suelo

El conocimiento de las potencialidades de los suelos, permiten plantear estrategias de manejo racional, toda vez que el suelo, es considerado como un recurso natural no renovable; los problemas de erosión, provocan que se pierdan grandes cantidades de suelo y su restitución por procesos naturales es muy lento, y esta misma se puede perder tan solo en una campaña agrícola en época de lluvias, por un manejo inadecuado del recurso. Las condiciones climáticas en la zona de intervención del proyecto, favorecen el uso del suelo de manera productiva, permiten la práctica de una agricultura en seco y con riego, siendo despensa y soporte natural de las plantas cultivadas y naturales, es el soporte para actividades como cultivos agrícolas como papa, habas, oca, maíz amiláceo, avena forrajera, tarwi, mashua, avena grano, trigo, cebada forrajera habas, pastos cultivados, hortalizas, y floricultura; implementación de sistemas de riego, repoblación de plantas, aprovechamiento y tratamiento forestal, instalación de pastizales para sistemas de pastoreo. La infraestructura agrícola identificada en la zona, es muy variada en relación con el clima, relieve y presencia del recurso hídrico, es así que por lo general existen invernaderos o fitotoldos, con fines principalmente para el cultivo de hortalizas, las que por las condiciones de la zona, no pueden crecer normalmente en el clima que presenta. (Municipalidad Distrital de Ocongate, 2012)

c) Flora

En el Distrito de Ocongate, existen pequeños fragmentos de bosques nativos en áreas alejadas, en total tienen una extensión de 4473.69 Ha los cuales se ven asociados a vegetación arbustiva, que por sus características bioclimáticas permite mantener una agricultura de secano, por las actividades humanas extractivas es aconsejable propiciar actividades de reforestación para recuperación de la cubierta vegetal como política de conservación, las especies existentes en la zona es principalmente de tipo arbóreo constituido por especies importantes como el chilca (*Baccharis halimifolia*), llauilli (*Barnadesia horrida* M.), quiswar (*Buddleja incana*), etc. Y especies de tipo maderable como Queuña (*Polylepis* spp.), Tankar (*Berberis vulgaris*), etc. (Municipalidad Distrital de Ocongate, 2012)

d) Hidrografía

Según la clasificación planteada por el proyecto de Manejo de Cuencas DSMC-DGASI en 1993, se denomina Cuencas a las comprendidas entre 700 - 6000 Km², Sub cuencas están comprendidos entre 100 a 700 Km² y se les denomina microcuencas aquellas comprendidas entre 10 a 100 Km² de superficie. La cabecera de cuenca del río Mapacho que comprende los distritos de Ocongate, Ccarhuayo y Ccatcca, presenta una alta variabilidad en relación a la gradiente altitudinal con características climáticas variadas y con una alta biodiversidad relacionada a la presencia de una variada vegetación. La vegetación nativa ha sido fuertemente explotada con fines energéticos, herramientas entre otros. (Municipalidad Distrital de Ocongate, 2012)

3.5 MATERIALES DE ESTUDIO

3.5.1 Población

Vacunos de edades mayores a los 6 meses de las comunidades Campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del distrito de Ocongate, Provincia de Quispicanchi.

3.5.2 Tamaño de muestra.

El tamaño de muestra fue obtenida teniendo en cuenta un nivel de confianza de 94% y error de precisión de 0.06%, mediante el método no paramétrico de muestreo simple al azar. El tamaño de muestra se obtendrá de acuerdo a la población de vacunos de las comunidades de Andamayo, Ccolcca y Lauramarca del distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchi. Dicho tamaño de muestra se determinara con la siguiente formula.

$$n = \frac{N * Z^2 * p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 * (p * q)}$$

Dónde:

N: tamaño poblacional

Z: 1, 96 nivel de confianza que se da a la muestra

p: animales positivos a LBV 0,5

q: animales negativos a LBV 0,5

E: error experimental 0,06

Considerando una población base de 1753 vacunos en las comunidades Campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del distrito de Ocongate de la región Cusco. (INEI, 2012)

Tabla 3. Distribución del tamaño de muestra para cada comunidad.

Comunidad	Población total	Tamaño de muestra
Ccolcca	1160	205
Andamayo	70	55
Lauramarca	523	168
Total	1753	428

Tabla 4. Distribución del tamaño de muestra según categoría.

ANIMALES POR CATEGORIA				
	Edad	Ccolcca	Andamayo	Lauramarca
DL	1 año	57	14	59
2D	1 1/2 – 2 años	14	7	8
4D	2 – 2 1/2 años	19	8	17
6D	3 – 3 1/2 años	15	3	15
BLL	≥ 4 años	100	23	69
SUBTOTAL		205	55	168
TOTAL			428	

3.5.3 De las muestras.

Las muestras estuvieron constituidas por suero sanguíneo de 428 vacunos mayores a los 6 meses.

3.5.3.1 Materiales para la toma de muestra

- Tubos vacutainer
- Agujas vacutainer
- Alcohol
- Algodón
- Gradillas
- Etiquetas para rotular las muestras(plumón indeleble)
- Guantes descartables
- Mandil
- Soga
- Baterías
- Lapicero
- Fichero y registros

3.5.3.2 Materiales y equipos para la obtención del suero.

- Centrifuga NF 200
- Viales criogénicas de 4,5 ml
- Etiquetas para rotular (plumón indeleble)
- Congelador a -20°C (Electrolux)
- Guantes
- Mandil
- Gorros y barbijos

3.5.3.3 Materiales y equipos de laboratorio

3.5.3.3.1 Equipos e instrumentos (Método de Elisa Indirecta)

- Lavador de placa Elisa (Benchmark)

- Estufa de incubación a 38 °C(BOEKEL)
- Refrigeradora
- Congeladora a -20°C
- Micropipetas de 30 - 300 µl y 100-1000 µl
- Lector de microplacas ELISA
- Vortex u homogenizador (VORTEX 2 GENIE-Scientific Industries)
- Cabina de flujo laminar (Telstar Bio IIA)
- Probetas de 20-1000ml

3.5.3.3.1.1 Materiales para el procesamiento de muestras

- Micropipetas de precisión (30-300 µl y 100-1000 µl)
- Puntas desechables (200-300µl)
- Caja porta tips
- Agua destilada o des ionizada
- Espectrofotómetro para placas
- Papel absorbente
- Parafilm
- Probetas de 100-1000ml
- Gorros
- Barbijo
- Mandil
- Guantes
- Cronometro

3.5.3.3.1.2 Reactivos para el análisis de la LEB en el laboratorio

- Kit ELISA para prueba de Leucosis Bovina (laboratorio IDEXX)

- Suero sanguíneo para cada pocillo
- control positivo y negativo
- Solución de lavado
- Solución diluyente
- Solución conjugado
- Solución stop (frenado)

3.5.3.3.2 Equipos e instrumentos (Método de PCR-TR)

- Micro Centrifuga (AL220VAC).
- Cabina de flujo laminar (Kossodo), (BIOBASE).
- Equipo de PCR (Applied Biosystems).
- Vortex (VORTEX 2 GENIE).
- Micropipetas de (1 - 20 μ l; 20 – 200 μ l y 100 - 1000 μ l).
- Rack Magnético (BioLabs).

3.5.3.3.2.1 Materiales para el Procesamiento de Muestras

- Tips desechables y estériles.
- Viales criogénicas de 2.5 ml y 5 ml.
- Barbijos, gorros y guantes de látex
- Lentes.
- Mandiles descartables.
- Cronometro.
- Multiportador de tubo para el vortex.
- Tubos de reacción rápida (8 tubos/tira).
- Tapa de tubos de reacción rápida.

3.5.3.3.2.2 Reactivos para la extracción del RNA del Virus de la Leucosis

Bovina.

- Kit extractor de RNA
 - MagMAX™ CORE Lysis Solution
 - MagMAX™ CORE Binding Solution
 - MagMAX™ CORE Wash Solution 1
 - MagMAX™ CORE Wash Solution 2
 - MagMAX™ CORE Elution Buffer
 - MagMAX™ CORE Magnetic Beads
 - MagMAX™ CORE Proteinase K

3.5.3.3.2.3 Reactivos para la identificación del Virus de la Leucosis

Bovina.

- Kit de PCR – tiempo real para LVB
 - BLV primer/probe mix
 - BLV RT primer mix
 - Positive control template
 - Oasig™ OneStep 2xqRT-PCR MasterMix
 - RNase/DNase free water

3.6 METODOLOGÍA

3.6.1 Toma de muestras

Las muestras de suero fueron colectadas de vacunos mayores a seis meses de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca del distrito de Ocongate. Dichas muestras de suero se obtuvieron por punción de la vena coccígea previa desinfección con alcohol, para lo cual se utilizó tubos vacutainer de 10 ml con separador de suero al vacío, una vez obtenida las muestras de sangre se rotulo con los datos del vacuno muestreado (N° muestra, nombre, edad, raza, sexo y manifestaciones clínicas) (ver anexo 10); las cuales después de la colección se trasladaron y conservaron en refrigeración en el laboratorio de salud animal de la escuela profesional de zootecnia, facultad de Ciencias Agrarias- UNSAAC.



Fotografía 2: Toma de muestras de sangre

3.6.2 Obtención del suero.

Para la obtención de suero se centrifugó todas las muestras sanguíneas a 3000 rpm durante 10 min, posteriormente se extrajo el suero en crioviales de 2.0 ml, se sellaron e identificaron los crioviales con un número, el cual debe coincidir con la hoja de campo, donde constan los datos de cada animal; luego se conservó en la congeladora a -20 °C hasta el momento del análisis serológico.



Fotografía 3: Obtención de suero sanguíneo de los tubos vacutainer.



Fotografía 4: Alicotación del suero sanguíneo

3.6.3 Metodología de laboratorio.

Se utilizara el método de ELISA indirecta y PCR-TR, para detectar los anticuerpos y antígenos (virus) respectivamente.

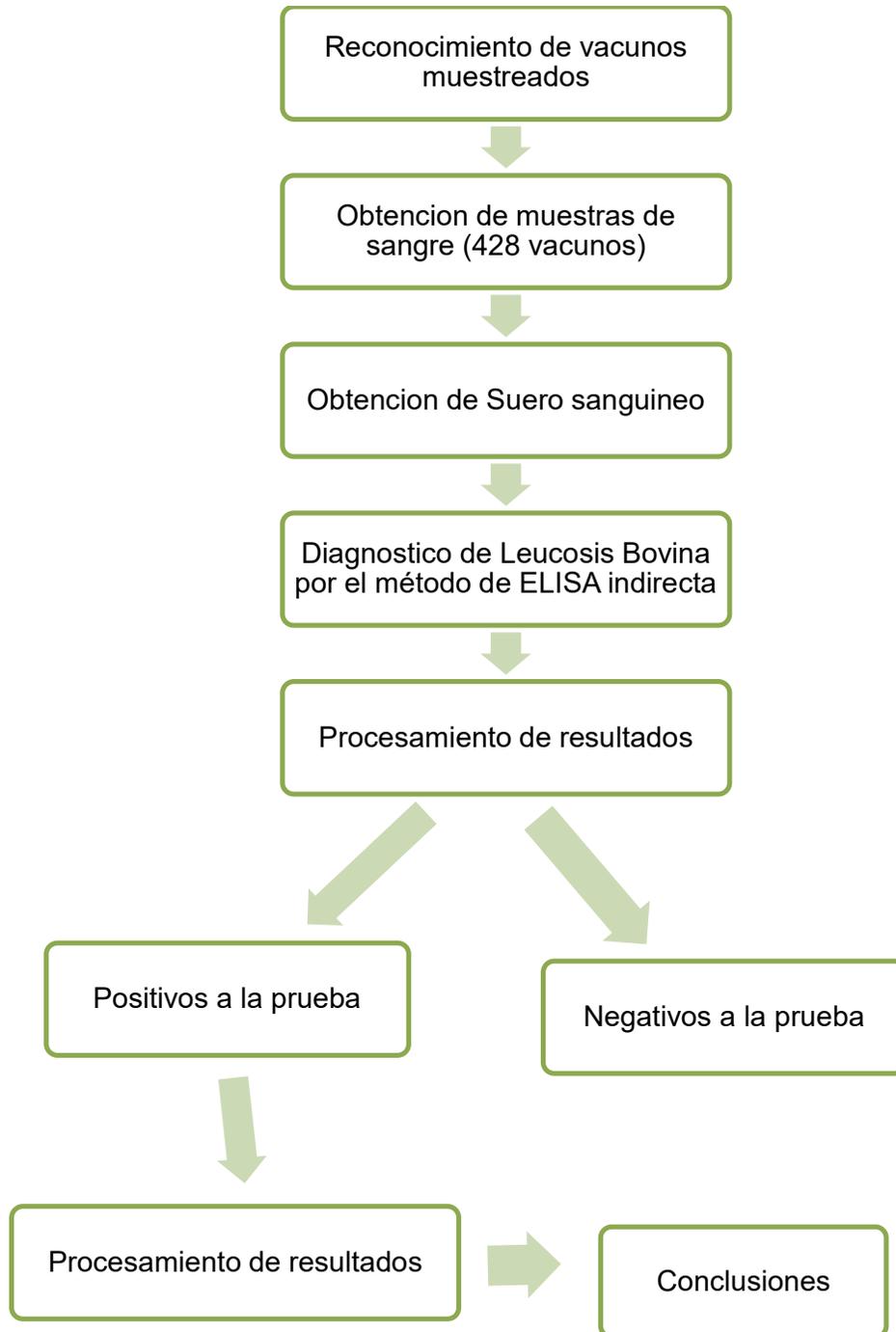


Gráfico 1: Flujograma de trabajo para la determinación de la LEB por el método de ELISA Indirecta

3.6.3.1.1 Método de Elisa indirecta para la Leucosis Bovina.

3.6.3.1.1.1 Descripción y principios de la prueba (según el kit de laboratorio IDEXX)

Las placas de microtitulación se suministran tapizadas con un antígeno inactivo. Las diluciones de las muestras que van a ser procesadas se incuban en los pocillos. Cualquier anticuerpo específico frente al VLB se une al antígeno que Hpocillo. El material que no ha quedado unido se elimina de los pocillos mediante lavado. A continuación se añade un conjugado formado por una IgG anti- rumiantes marcados con la enzima peroxidasa, susceptibles de unirse a los anticuerpos de bovino que formaron el complejo con el antígeno del VLB. El conjugado no unido se elimina mediante lavado, y se añade un substrato TMB a los pocillos. El grado de color desarrollado (densidad óptica medida a 450nm) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específico frente al VLB presente en la muestra. La relevancia diagnóstica del proceso se obtiene comparando la densidad óptica de los pocillos con la muestra de la densidad óptica de los pocillos que contienen control positivo.

3.6.3.1.1.2 Preparación de reactivos

- **Solución de Lavado**

La solución de Lavado Concentrada (10X) debe dejarse que se adquiera 18- 26°C y agitarse para asegurar la disolución de posibles sales precipitadas. Esta solución deberá de diluirse 1/10 con agua destilada/desionizada antes de emplearla (por ej. 30 ml de Solución de Lavado Concentrada (10X) más de 270 ml de agua por placa por analizar). Preparándose en condiciones estériles, la solución de lavado puede almacenarse durante una semana a 2-8°C.

Tabla 5. Distribución de la placa de ELISA indirecta para Leucosis Bovina de las comunidades Andamayo, Ccolcca y Lauramarca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
B	CP	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
C	CN	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
D	CN	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
E	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
F	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
G	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M

Dónde:

- CP = Control positivo
- CN = Control negativo
- M = Muestra de suero.

3.6.3.1.1.3 Protocolo del ensayo (Leucosis bovina)

Debe dejarse que todos los reactivos adquieran 18-26°C antes de usarlos. Los reactivos deberán mezclarse invirtiéndolos o agitándolos en un vortex suavemente. Use la punta de pipeta diferente para cada muestra.

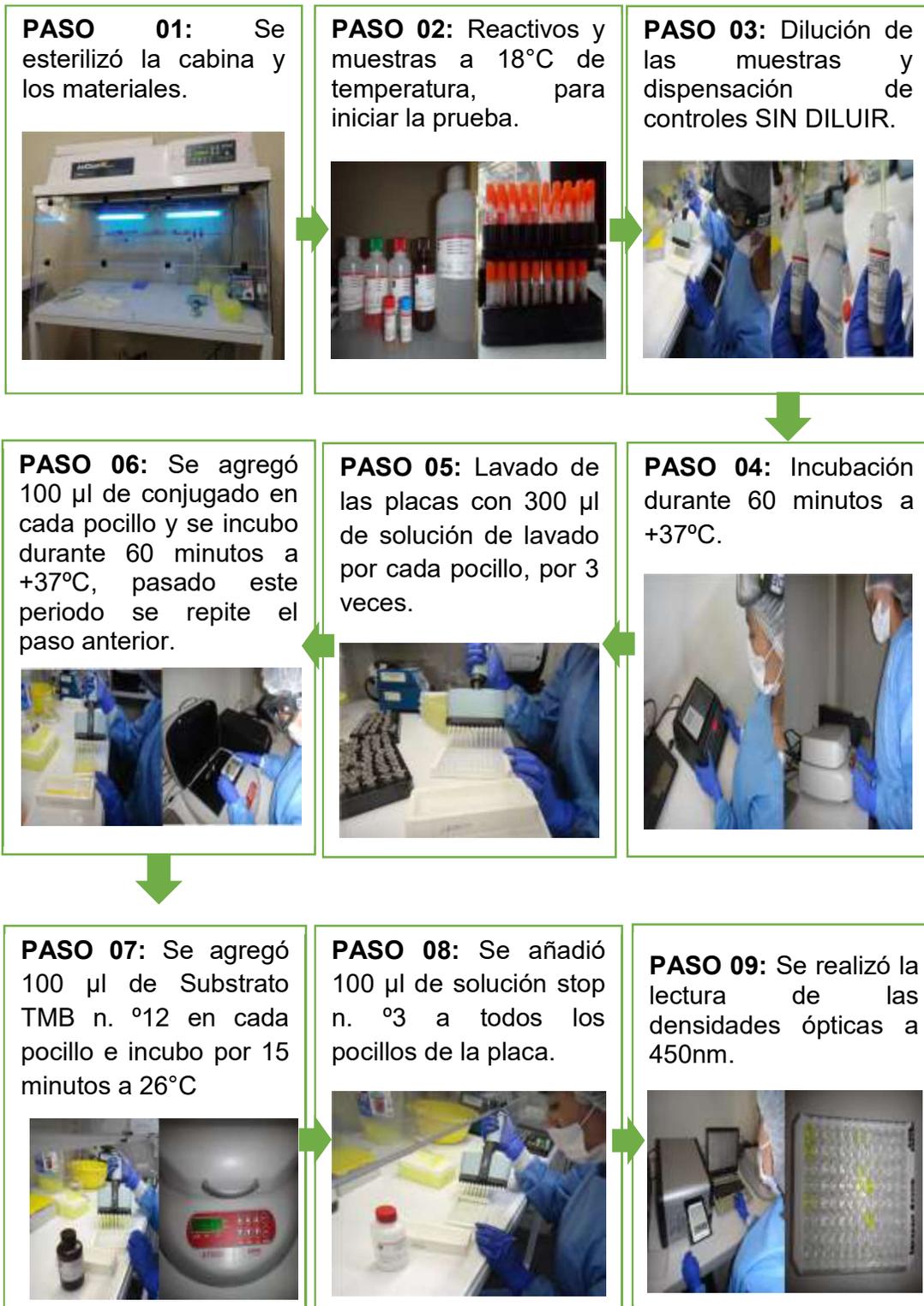
1. Dispensar 90 µl de Diluyente de Muestras en cada pocillo de la placa de microtitulación.
2. Dispensar 10 µl de control positivo SIN DILUIR y en los pocillos apropiados.

Dispensar 10 µl de control negativo y 10 µl de cada muestra SIN DILUIR en los pocillos apropiados.

Dilución final de los controles y muestras = 1/10

3. Homogenizar el contenido de los pocillos mediante una breve y suave agitación de la placa (puede usarse para ello un agitador de placas).
4. Cubrir la placa de microtitulación con una cubierta e incubar 60 minutos (± 5 minutos) a $+37^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) en cámara húmeda o 14-18 horas a $18-26^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda.
5. Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de solución de lavado tres veces. Aspire los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Después de la aspiración final, elimine el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
6. Dispensar 100 µl conjugado en cada pocillo.
7. Cubrir e incubar la placa de microtitulación cubierta durante 60 minutos (± 5 minutos) a $+37^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) en cámara húmeda.
8. Repita el paso 5.
9. Dispensar 100 µl de Substrato TMB n. °12 en cada pocillo.
10. Incubar la placa con $18-26^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos (± 1 minuto).
11. Frenar la reacción dispensando 100 µl por pocillo de Solución de Frenado n. °3. La solución de Frenado n. °3 debe dispensarse en el mismo orden y al mismo ritmo que la dispensación del substrato TMB.
12. Leer los resultados con un fotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

3.6.3.1.1.3.1 Metodología de ELISA Indirecta para Leucosis Bovina:



3.6.3.1.1.4 Validación de la prueba de la Leucosis Bovina

Para la validación de la placa, la densidad óptica de Control Positivo (CPx) no debe ser superior a 2,000 y la densidad óptica de Control Negativo (CNx) no debe de exceder de 0,500. La diferencia de la densidad óptica entre los controles positivos y negativos (CPx – CNx) debe ser $\geq 0,300$. Las placas deben ser leídas dentro de un periodo máximo de 2 horas tras añadir la Solución de Frenado.

a) Cálculos

Debe obtenerse el valor medio de la densidad óptica de las muestras duplicada. La densidad óptica de control positivo (CPx) así como la densidad óptica de muestras (Muestra A₄₅₀) deben corregirse restándoles el valor de la densidad óptica de control negativo (CNx).

Control positivo:

Muestra:

CPx – CNx

Muestra A450 – CNx

El valor de cada muestra debe calcularse con relación al Control Negativo y Control Positivo con la siguiente formula:

$$M/P = 100 \times \frac{\text{Muestra A 450} - \text{CNx}}{\text{CPx} - \text{CNx}}$$

b) Interpretación de resultados

Interpretación de muestra individual:

Tabla 6 Interpretación de Muestra Individual

<i>M/P %</i>	<30%	≥ 30% y < 40%	≥ 40%
Interpretación	Negativo	Dudoso	Positivo

FUENTE: IDEXX Leukosis Serum X2

Si una muestra continua siendo dudosa tras una segunda prueba, debería obtenerse una nueva muestra del mismo animal para ser analizada. Si con la nueva muestra se obtiene de nuevo un resultado dudoso, debería contemplarse la situación epidemiológica. Analizar de nuevo la muestra con otra técnica si fuera posible.

3.6.3.1.1.5 Prevalencia

Para determinar la prevalencia de la Leucosis Bovina en el ganado bovino utilizaremos la siguiente fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Total de animales (ganado) positivos a LEB}}{\text{Total de animales (ganado) muestreados}} \times 100$$

3.6.3.1.1.6 Intervalo de Confianza

$$IC(p) = p \pm z_{\alpha/2} \sqrt{\frac{p \cdot q}{n}}$$

Dónde:

n= Es el tamaño muestral.

p= proporción obtenida en nuestra muestra.

q= 1-p

$z_{\alpha/2}=1.89$ en el caso de definir un nivel de confianza del 94%

3.6.3.1.2 Método PCR en Tiempo Real para la Leucosis Bovina

3.6.3.1.2.1 Descripción y principios de la prueba

Se proporciona una mezcla de cebador y sonda específica del VLB y esto se puede detectar a través del canal FAM.

La mezcla de cebador y sonda proporcionada explota el llamado principio TaqMan®. Durante la amplificación por PCR, los cebadores directos e inversos se hibridan con el ADNc del VLB. Se incluye una sonda fluorogénica en la misma mezcla de reacción que consiste en una sonda de ADN marcada con un colorante de 5' y un apagador de 3'. Durante la amplificación por PCR, la sonda se escinde y el colorante indicador y el extintor se separan. El aumento resultante en la fluorescencia puede detectarse en una gama de plataformas de PCR en tiempo real.

3.6.3.1.2.2 Extracción del Material Genético

3.6.3.1.2.2.1 Preparación de las Muestras y Reactivos

- Esterilizar la cabina para evitar la contaminación de las muestras.
- Solución de lisis unión.

Realizar los cálculos para la cantidad de muestras a trabajar, siempre incluir el 10% de excedente para compensar la imprecisión del pipeteo.

Tabla 7 Cantidad de Reactivo por Reacción para la Solución de Lisis Unión.

Componente	Por reacción	Por reacción (+10%)
MagMAX™ CORE Lysis Solution	350 µl	385 µl
MagMAX™ CORE Binding Solution	350 µl	385 µl

- Solución de perlas magnéticas.

Realizar los cálculos para la cantidad de muestras a trabajar, siempre incluir el 10% de excedente para compensar la imprecisión del pipeteo.

Tabla 8 Cantidad de Reactivo por Reacción para la Solución de Perlas Magnéticas.

Componente	Por reacción	Por reacción (+10%)
MagMAX™ CORE Magnetic Beads	20 µl	22 µl
MagMAX™ CORE Proteinase K	10 µl	11 µl

- Descongelar las muestras de suero sanguíneo y homogenizar.

3.6.3.1.2.2 Procedimiento para la Extracción del Material Genético

- En un vial criogénica marcar LU (solución de lisis unión), mezclar 385 µl de MagMAX™ CORE Lysis Solution y 385 µl de MagMAX™ CORE Binding Solution.
- En un vial criogénico marcar PM (solución de perlas magnéticas), mezclar 22 µl de MagMAX™ CORE Magnetic Beads y 11 µl de MagMAX™ CORE Proteinase K.
- Unión de ácidos nucleicos a las perlas magnéticas.
 1. Para una reacción combine en el siguiente orden:

Tabla 9 Combinación de reactivos por reacción.

Combinar	Componente	Cantidad
1	PM (solución de perlas magnéticas)	30 µl
2	Suero	200 µl
Antes del paso 3: mezclar mediante pipeteo y dejar incubar 2 minutos a T° Ambiente		
3	LU (solución de lisis unión)	700 µl

2. Usando un vortex, agitar a una velocidad moderada por 3 minutos.
3. Usando el rack magnético, capturar las perlas. El tiempo de captura es de 1 a 3 minutos.
4. Cuidadosamente aspire y descarte todo e sobrenadante sin remover la perlas.
5. Retire el tubo del rack magnético.

- Lavado de las perlas con MagMAX™ CORE Wash Solution 1.
 1. Adicionar 500 µl de MagMAX™ CORE Wash Solution 1 a cada tubo.
 2. Usando un vortex, agitar a una velocidad moderada por 1 minuto.
 3. Usar un rack magnético para capturar las perlas. El tiempo de captura es de aproximadamente 1 minuto. Cuando la muestra se torne transparente, las perlas habrán sido capturadas.
 4. Cuidadosamente aspire y descarte todo el sobrenadante sin remover las perlas.
 5. Retire el o los tubos del rack magnético.

- Lavado de las perlas con MagMAX™ CORE Wash Solution 2.
 1. Adicionar 500 µl de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 a cada tubo.
 2. Usando un vortex, agitar a una velocidad moderada por 1 minuto.
 3. Usar un rack magnético para capturar las perlas. El tiempo de captura es de aproximadamente 1 minuto. Cuando la muestra se torne transparente, las perlas habrán sido capturadas.
 4. Cuidadosamente aspire y descarte todo el sobrenadante sin remover las perlas.
 5. Retire el o los tubos del rack magnético.

- Secado de las perlas.
 1. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente durante 2 minutos para que el alcohol restante de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 se evapore.
 2. Inspeccionar el tubo y si hay solución residual, quite lo más posible con una pipeta de punta fina, dejar el tubo abierto en el rack magnético por otro minuto.

- Elución de ácidos nucleicos.
 1. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente durante 2 minutos para permitir que el alcohol restante de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 se evapore.
 2. Adicionar 90 µl de MagMAX™ CORE Elution Buffer pre calentado a 65°C a cada tubo.
 3. Usando un vortex, agite vigorosamente durante 3 minutos, la muestra debe tornarse marrón, indicando la completa suspensión de las perlas.
 4. Usando un rack magnético capture las perla, la captura de tardar aproximadamente 2 minutos.
 5. Teniendo cuidado de no remover las perlas, transfiera 90 µl de sobrenadante a un vial criogénico limpio. No desechar el sobrenadante; los ácidos nucleicos purificados están en el sobrenadante.

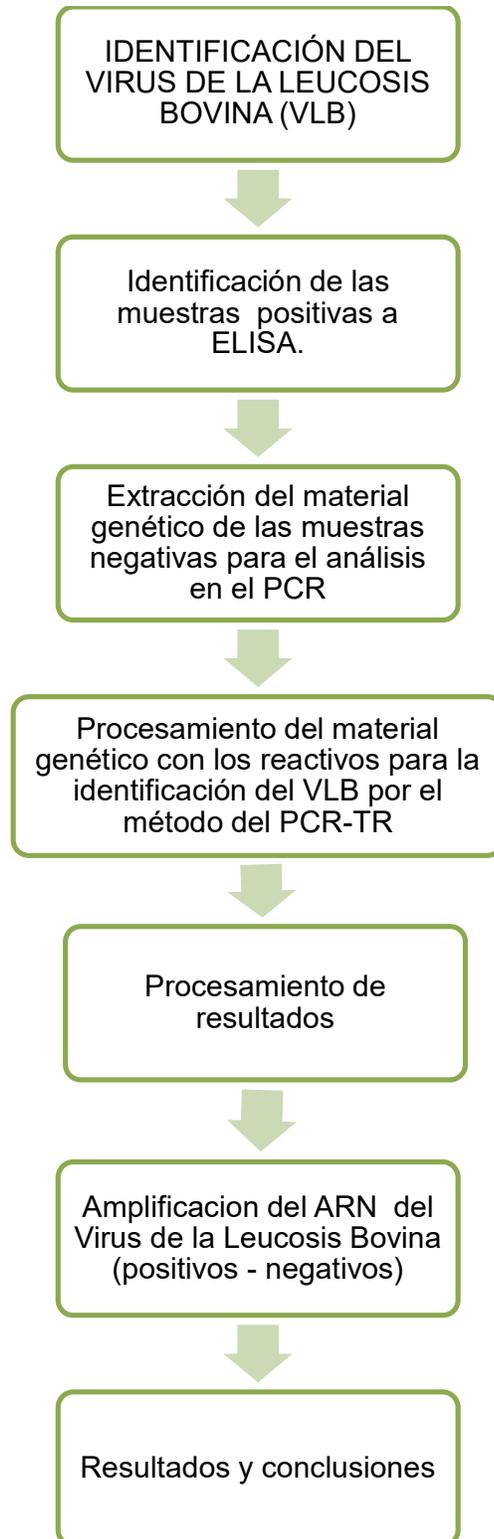


Gráfico 2: Flujograma de trabajo para la determinación de la LEB por el método de PCR en tiempo real

3.6.3.1.2.2.3 Metodología de la Extracción del Material Genético:

PASO 01: Se esterilizó la cabina, los materiales y marcar los viales criogenios con el numero de muestra.



PASO 02: Realizar la mezcla de la solución Perlas Magnéticas (PM). Con 350µl de Proteinase K y 350µl de Magnetic beads.



PASO 03: Se realizó la mezcla de la solución Lisis unión (LU). Se adicono 20 µl Lysis solution y 10 µl de Binding solution).



PASO 06: Con el rack magnético se capturó las PM, durante 1 a 3 minutos, se descartó el sobrenadante sin remover las PM y sin retirar los viales criogénicos del rack magnético.



PASO 05: Usando un vortex se agitó a una velocidad moderada durante 3 minutos.



PASO 04: Se agregó 30 µl de PM, 200 µl de suero y 700 µl de LU.



PASO 07: Se adicionó 500 µl de Wash Solution 1 a cada tubo.



PASO 08: Usando un vortex se agito a una velocidad moderada durante 1 minutos.



PASO 09: Con el rack magnético se capturo las PM, durante 1 a 3 minutos, se descartó el sobrenadante, sin remover las PM ni retirar los viales criogénicos del rack magnético.





PASO 12: Con el rack magnético se capturo las PM, durante 1 a 3 minutos, se descartó el sobrenadante sin remover ni retirar los viales criogénicos del rack magnético.



PASO 11: Usando un vortex se agitó a una velocidad moderada durante 1 minutos.



PASO 10: Se adicionó 500 μ l de Wash Solution 2 a cada tubo



PASO 13: Se dejó abierto los viales criogénicos por 2 minutos para que el alcohol restante de wash solution 2 se evapore.



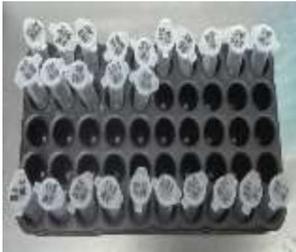
PASO 14: Se adicionó 90 μ L de Elution Buffer.



PASO 15: Usando un vortex se agito a una velocidad moderada durante 3 minutos.



PASO 18: Se extrajo el material genético (RNA) de 418 muestras de suero.



PASO 17: Con cuidado se transfirió 90 μ L de sobrenadante a un vial criogénico.



PASO 16: Con el rack magnético se capturo las perla magnéticas, durante 2 minutos.



3.6.3.1.2.3 Protocolo de detección de PCR- TR en un solo paso.

3.6.3.1.2.3.1 Protocolo de Reconstitución

Para minimizar el riesgo de contaminación con ADN extraños, recomendamos que todos los pipeteados se realicen en un ambiente limpio de PCR. Idealmente, esto sería un laboratorio de PCR designado o un gabinete de PCR. Se recomiendan puntas de filtro para todos los pasos de pipeteo y la esterilización de la cabina durante 15 minutos.

3.6.3.1.2.3.1.1 Reconstitución de los componentes del kit

- Gire por pulso cada tubo en una centrifuga antes de abrir. Esto asegura que la mezcla de imprimación y sonda liofilizada este en la base del tubo y que no se derrame al abrir el tubo.
- Reconstituir los componentes del kit con agua libre de nucleasas, de acuerdo con la siguiente tabla:

Para asegurar una resuspensión completa, agite bien cada tubo.

Tabla 10 Cantidad de Agua Libre de Nucleasas para la Reconstitución de los Componentes del Kit

Componente - Resuspender en agua	Volumen
Pre-PCR pack	
Mezcla de cebador/sonda de BLV (MARRON)	165 µl
Mezcla del cebador /sonda de control de la extracción interna (MARRON)	165 µl
Mezcla de cebador RT BLV RT (VERDE)	165 µl
Mezcla del cebador /sonda de control endógeno (MARRON)	165 µl
Lámina sellada por calor Pre-PCR	
Control de extracción interno de RNA (AZUL)	600 µl

- Reconstituir la plantilla de control positivo en el búfer de preparación de plantilla suministrado, de acuerdo con la siguiente tabla:

Para asegurar la resuspensión, agite bien cada tubo.

Tabla 11 Cantidad de Buffer de Preparación de Plantilla para la Reconstitución de los Componentes del Kit

Resuspensión de componentes en el buffer de preparación de plantillas	Volumen
Lamina termosellada Post PCR	
Plantilla de Control Positivo (ROJO)	500 µl

3.6.3.1.2.3.2 Protocolo de Detección PCR- TR en un solo paso, para la

Identificación del VLB

Un método de un solo paso que combina la transcripción inversa y la amplificación en un único tubo cerrado es el método preferido. Para un óptimo rendimiento y sensibilidad. Todos los pasos de pipeteo y la instalación experimental de la placa se deben realizar en hielo. Después de que se vierte la placa, proceda inmediatamente al protocolo de amplificación de Un Paso. La incubación prolongada de mezclas de reacción a temperatura ambiente puede conducir a artefactos de PCR que reducen la sensibilidad de detección.

Todos los pasos de pipeteado y la placa experimental deben realizarse sobre hielo.

1. Para cada muestra de ARN prepare una mezcla de reacción de acuerdo con la siguiente tabla:

Incluir reacciones suficientes para controles positivos y negativos.

Tabla 12 Mezcla de Reacción para las Muestra de ARN

Componente	Volumen
Mezcla Maestra oasig TM OneStepPLUS 2x qRT-PCR	10 µl
Mezcla de cebador/sonda de BLV.(MARRON)	1 µl
Mezcla del cebador /sonda de control de la extracción interna (MARRON)	1 µl
Agua libre de ARNasa / ADNasa (BLANCO)	3 µl
Volumen Final	15 µl

1. Para cada muestra de RNA, prepare una mezcla de reacción de control endógeno de acuerdo con la siguiente tabla:

Esta reacción de control proporcionara información crucial sobre la calidad de la muestra biológica.
2. Pipetee 15µl de esta mezcla en cada pocillo de acuerdo con la configuración de la placa experimental de su PCR en tiempo real.
3. Pipetee 5 µl de plantilla de RNA dentro de cada pocillo, de acuerdo con con la configuración de su placa experimental. Para el pocillo de control negativo use 5 µl de agua libre de RNAsa / DNAsa. El volumen final en cada pocillo es de 20 µl.

3.6.3.1.2.4 Protocolo de amplificación de un paso

Condiciones de amplificación utilizando la mezcla maestra oasig™
OneStep 2x RT-qPCR.

Tabla 13: Proceso de Amplificación

	Etapas	Tiempo	T°
	Transcripción Inversa	10 mins	55 °C
	Activación de Enzima	2 mins	95 °C
Ciclo x50	Desnaturalización	10 secs	95 °C
	Recolección de Información	60 secs	60 °C

* Los datos fluorogénicos deben recogerse durante este paso a través de los canales FAM y VIC

3.6.3.1.2.5 Interpretación de resultados

Tabla 14 Interpretación de Resultados

Objetivo (FAM)	Control Interno (VIC)	Control Positivo	Control Negativo	INTERPRETACIÓN
≤ 30	+ / -	+	-	RESULTADO CUANTITATIVO POSITIVO Calcular el número de copia
> 30	-	+	-	RESULTADO CUALITATIVO POSITIVO No informe el número de copias, ya que esto puede deberse a una pobre extracción de la
-	+	+	-	RESULTADO NEGATIVO
+ / -	+ / -	+	≤ 35	FALLO EL EXPERIMENTO Debido a contaminación en la prueba.
-	-	+	-	FALLO EN LA PREPARACION DE LA MUESTRA
+ / -	+ / -	-	+ / -	FALLO EL EXPERIMENTO

Se espera que la plantilla de control positivo (Rojo) amplifique entre Cq 16 y 23. El no cumplir este criterio de control de calidad es una fuerte indicación de que el experimento ha sido comprometido.

3.6.3.1.2.5.1 Procedimiento para la reconstitución de los componentes del kit para la identificación del LVB por el método de PCR Tiempo real

- Se reconstituyó los componentes del kit en agua libre de RNasa/DNasa



- Reconstitución de la plantilla de control positivo en el tampón de preparación de plantilla suministrado:



3.6.3.1.2.5.2 Metodología de detección PCR – TR en un solo paso, para la identificación del VLB.

PASO 01: Se esterilizó la cabina exclusiva para la preparación de las mezclas (master mix).



PASO 02: Se configuró el equipo del RT-PCR



PASO 04: Se selló los tubos de reacción rápida con sus respectivas tapas, para evitar la contaminación de las muestras.



PASO 03: Se agregó 15 µl de la mezcla en cada tubo de reacción rápida, 5 µl de control positivo en el tubo de reacción rápida para el control positivo, 5 µl de agua libre de RNAsa/DNAsa en el tubo de reacción rápida del control negativo, 5 µl de RNA sin diluir en cada tubo de reacción rápida de acuerdo con la configuración de la placa experimental de PCR- TR.



PASO 06: Se agitó en el vortex los pocillos a una velocidad moderada para garantizar la homogeneidad de las mezclas.



PASO 07: Se ubicó cada pocillo de acuerdo con la configuración de la placa experimental y se dio inicio a la amplificación en RT-PCR.



CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 PREVALENCIA DE LA LEUCOSIS BOVINA EN VACUNOS DE LAS COMUNIDADES DE CCOLCCA, ANDAMAYO Y LAURAMARCA.

4.1.1 Determinación cualitativa del grado de infección en vacunos de las comunidades Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Las muestras de sueros positivos reaccionaron a la presencia de los antígenos presentes en la placa. Una vez añadida la solución de frenado n°3 se genera una coloración que vira a amarilla. El grado de color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico frente al VLB presente en la muestra.



Fotografía 5: Resultados cualitativos para Leucosis Bovina de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

A la observación cualitativa de la reacción final en la fotografía 5, se consideran positivos a los pocillos que presentaron coloración y negativos a los

que no presentaron coloración, por tanto se obtuvo un total de 2 vacunos para la comunidad de Ccolcca, 8 vacunos positivos para la comunidad de Lauramarca y ningún vacuno positivo para la comunidad de Andamayo.

Tabla 15. Resultado cualitativo para Leucosis Bovina de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca

Coloración	Total/ vacunos	Comunidad		
		Ccolcca	Andamayo	Lauramarca
Amarillo (positivos)	10	2	0	8
Incoloro (negativos)	418	203	55	160
Total	428	205	55	168

En la tabla 15 se observa que, de un total de 428 vacunos muestreados de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca, a la observación cualitativa resultaron 10 vacunos positivos y 418 vacunos negativos de las tres comunidades en estudio.

4.1.2 Determinación cuantitativa del grado de infección en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Las lecturas de las densidades ópticas se realizó con el lector de microplacas Elisa (Epoch 2) a 450nm.

Tabla 16. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Andamayo y Ccolcca (Placa I)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,941	0,042	0,043	0,047	0,042	0,043	0,043	0,042	0,043	0,043	0,056	0,043
B	1,157	0,059	0,041	0,043	0,044	0,041	0,043	0,044	0,041	0,042	0,041	0,095
C	0,047	0,043	0,044	0,043	0,046	0,042	0,043	0,048	0,045	0,043	0,05	0,053
D	0,193	0,044	0,049	0,047	0,044	0,041	0,042	0,044	0,045	0,043	0,048	0,067
E	0,046	0,042	0,045	0,046	0,044	0,045	0,043	0,114	0,047	0,043	0,05	0,097
F	0,056	0,054	0,045	0,043	0,047	0,043	0,046	0,064	0,042	0,045	0,111	0,044
G	0,043	0,043	0,042	0,041	0,102	0,048	0,067	0,048	0,047	0,053	0,061	0,046
H	0,043	0,043	0,049	0,046	0,078	0,041	0,043	0,043	0,051	0,048	0,045	0,046

*la coloración verde oliva indica el inicio de los vacunos pertenecientes a la comunidad campesina de Ccolcca.

Tabla 17. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Ccolcca (Placa II)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,993	0,05	0,051	0,075	0,123	0,087	0,091	0,073	0,071	0,117	0,056	0,07
B	1,013	0,081	0,117	0,079	0,076	0,059	0,207	0,075	0,07	0,061	0,058	0,073
C	0,198	0,156	0,086	0,055	0,078	0,084	0,101	0,133	0,059	0,068	0,081	0,068
D	0,081	0,131	0,073	0,07	0,054	0,063	0,126	0,072	0,063	0,066	0,064	0,076
E	0,069	0,059	0,081	0,101	0,083	0,066	0,094	0,056	0,076	0,059	0,092	0,08
F	0,06	0,056	0,053	0,066	0,074	0,081	0,055	0,06	0,057	0,093	0,069	0,088
G	0,059	0,053	0,056	0,057	0,425	0,054	0,076	0,075	0,083	0,067	0,144	0,072
H	0,05 9	0,06 8	0,05 8	0,05 6	0,07 1	0,14 9	0,15 7	0,06 2	0,09 4	0,09 2	0,05 9	0,05 2

Tabla 18. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Ccolcca y Lauramarca (Placa III)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,891	0,056	0,048	0,05	0,067	0,091	0,06	0,067	0,053	0,076	0,072	0,191
B	1,069	0,054	0,047	0,065	0,07	0,073	0,05	0,078	0,056	0,063	0,08	0,065
C	0,048	0,067	0,115	0,062	0,053	0,066	0,074	0,054	0,078	0,061	0,056	0,082
D	0,056	0,055	0,14	0,059	0,047	0,142	0,078	0,051	0,053	0,053	0,056	0,058
E	0,167	0,091	0,106	0,498	0,062	0,064	0,054	0,054	0,051	0,07	0,069	0,063
F	0,596	0,074	0,052	0,075	0,056	0,057	0,095	0,079	0,051	0,148	0,121	0,073
G	0,127	0,061	0,046	0,052	0,053	0,046	0,046	0,064	0,054	0,133	0,063	0,059
H	0,081	0,082	0,064	0,049	0,05	0,053	0,059	0,059	0,094	0,052	0,145	0,077

*la coloración verde oliva indica el inicio de los vacunos pertenecientes a la comunidad campesina de Lauramarca.

Tabla 19. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa IV)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,103	0,053	0,05	0,061	0,047	0,083	0,051	0,081	0,069	0,06	0,074	0,07
B	0,933	0,06	0,087	0,051	0,051	0,05	0,058	0,086	0,048	0,051	0,065	0,051
C	0,052	0,048	0,05	0,068	0,072	0,051	0,053	0,057	0,089	0,068	0,059	0,062
D	0,053	0,062	0,071	0,058	0,062	0,053	0,049	0,056	0,075	0,049	0,073	0,094
E	0,049	0,059	0,053	0,053	0,053	0,559	0,055	0,075	0,061	0,051	0,071	0,065
F	0,073	0,054	0,049	0,051	0,045	0,049	0,052	0,047	0,049	0,16	0,048	0,535
G	0,048	0,044	0,043	0,047	0,05	0,049	0,062	0,048	0,051	0,057	0,055	0,058
H	0,051	0,089	0,049	0,108	0,048	0,054	0,058	0,051	0,053	0,056	0,065	0,073

Tabla 20. Densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa V)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,538	0,081	0,049	0,052	0,047	0,043	0,374	0,047				
B	0,597	0,053	0,057	0,053	0,046	0,046	0,046	0,05				
C	0,053	0,067	0,049	0,051	0,056	0,044	0,336	0,043				
D	0,052	0,057	0,05	0,047	0,063	0,045	0,505	0,832				
E	0,403	0,066	0,05	0,045	0,045	0,047	0,1	0,046				
F	0,056	0,047	0,049	0,057	0,052	0,066	0,048	0,867				
G	0,094	0,082	0,052	0,047	0,059	0,053	0,043	0,043				
H	0,052	0,104	0,061	0,063	0,06	0,045	0,046	0,042				

En las tablas del 16 al 20 tenemos las densidades ópticas resultantes al medir absorbancia a 450nm, En el lector de microplacas de ELISA, donde:

- **Control positivo= A1, B1**
- **Control negativo = C1, D1**
- Muestra de vacunos de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Tabla 21. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Andamayo y Ccolcca (Placa I)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	88,37	-8,40	-8,29	-7,86	-8,40	-8,29	-8,29	-8,40	-8,29	-8,29	-6,89	-8,29
B	111,63	-6,57	-8,50	-8,29	-8,18	-8,50	-8,29	-8,18	-8,50	-8,40	-8,50	-2,69
C	-7,86	-8,29	-8,18	-8,29	-7,97	-8,40	-8,29	-7,75	-8,07	-8,29	-7,53	-7,21
D	7,86	-8,18	-7,64	-7,86	-8,18	-8,50	-8,40	-8,18	-8,07	-8,29	-7,75	-5,71
E	-7,97	-8,40	-8,07	-7,97	-8,18	-8,07	-8,29	-0,65	-7,86	-8,29	-7,53	-2,48
F	-6,89	-7,10	-8,07	-8,29	37,67	-8,29	-7,97	-6,03	-8,40	-8,07	-0,97	-8,18
G	-8,29	-8,29	-8,40	-8,50	-1,94	-7,75	-5,71	-7,75	-7,86	-7,21	-6,35	-7,97
H	-8,29	-8,29	-7,64	-7,97	-4,52	-8,50	-8,29	-8,29	-7,43	-7,75	-8,07	-12,92

*la coloración verde oliva indica el inicio de los vacunos pertenecientes a la comunidad campesina de Ccolcca.

Tabla 22. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Ccolcca (Placa II)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,993	0,05	0,051	0,075	0,123	0,087	0,091	0,073	0,071	0,117	0,056	0,07
B	1,013	0,081	0,117	0,079	0,076	0,059	0,207	0,075	0,07	0,061	0,058	0,073
C	0,198	0,156	0,086	0,055	0,078	0,084	0,101	0,133	0,059	0,068	0,081	0,068
D	0,081	0,131	0,073	0,07	0,054	0,063	0,126	0,072	0,063	0,066	0,064	0,076
E	0,069	0,059	0,081	0,101	0,083	0,066	0,094	0,056	0,076	0,059	0,092	0,08
F	0,06	0,056	0,053	0,066	0,074	0,081	0,055	0,06	0,057	0,093	0,069	0,088
G	0,059	0,053	0,056	0,057	0,058	0,054	0,076	0,075	0,083	0,067	0,144	0,072
H	0,059	0,068	0,058	0,056	0,071	0,149	0,157	0,062	0,094	0,092	0,059	0,052

Tabla 23. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de las comunidades de Ccolcca y Lauramarca (Placa III)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	80,41	-4,79	-5,61	-5,40	-3,67	-1,22	-4,38	-3,67	-5,10	-2,75	-3,16	8,98
B	98,58	-5,00	-5,71	-3,87	-3,36	-3,06	-5,40	-2,55	-4,79	-4,08	-2,34	-3,87
C	-5,61	-3,67	1,23	-4,18	-5,10	-3,77	-2,96	-5,00	-2,55	-4,28	-4,79	-2,14
D	-4,79	-4,89	3,78	-4,49	-5,71	3,98	-2,55	-5,30	-5,10	-5,10	-4,79	-4,59
E	6,53	-1,22	0,31	40,31	-4,18	-3,98	-5,00	-5,00	-5,30	-3,36	-3,47	-4,08
F	50,31	-2,96	-5,20	-2,85	-4,79	-4,69	-0,81	-2,44	-5,30	4,60	1,84	-3,06
G	2,45	-4,28	-5,81	-5,20	-5,10	-5,81	-5,81	-3,98	-5,00	3,07	-4,08	-4,49
H	-2,24	-2,14	-3,98	-5,51	-5,40	-5,10	-4,49	-4,49	-0,91	-5,20	4,29	-2,65

*la coloración verde oliva indica el inicio de los vacunos pertenecientes a la comunidad campesina de Lauramarca.

Tabla 24. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para LVB, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa IV)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	97,94	-5,20	-5,50	-4,42	-5,79	-2,25	-5,40	-2,45	-3,63	-4,51	-3,14	-3,53
B	81,24	-4,51	-1,86	-5,40	-5,40	-5,50	-4,71	-1,96	-5,69	-5,40	-4,02	-5,40
C	-5,30	-5,69	-5,50	-3,73	-3,33	-5,40	-5,20	-4,81	-1,66	-3,73	-4,61	-4,32
D	-5,20	-4,32	-3,43	-4,71	-4,32	-5,20	-5,59	-4,91	-3,04	-5,59	-3,24	-1,17
E	-5,59	-4,61	-5,20	-5,20	-5,20	44,50	-5,00	-3,04	-4,42	-5,40	-3,43	-4,02
F	-3,24	-5,10	-5,59	-5,40	-5,99	-5,59	-5,30	-5,79	-5,59	5,31	-5,69	42,15
G	-5,69	-6,08	-6,18	-5,79	-5,50	-5,59	-4,32	-5,69	-5,40	-4,81	-5,00	-4,71
H	-5,40	-1,66	-5,59	0,20	-5,69	-5,10	-4,71	-5,40	-5,20	-4,91	-4,02	-3,24

Tabla 25. Resultados del cálculo del porcentaje M/N de las densidades ópticas para Leucosis Bovina, en vacunos de la comunidad de Lauramarca (Placa V)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	80,30	-0,23	-5,87	-5,34	-6,22	-6,92	51,40	-6,22				
B	90,70	-5,16	-4,46	-5,16	-6,40	-6,40	-6,40	-5,69				
C	-5,16	-2,69	-5,87	-5,51	-4,63	-6,75	44,71	-6,92				
D	-5,34	-4,46	-5,69	-6,22	-3,40	-6,57	74,49	132,11				
E	56,51	-2,87	-5,69	-6,57	-6,57	-6,22	3,12	-6,40				
F	-4,63	-6,22	-5,87	-4,46	-5,34	-2,87	-6,04	138,27				
G	2,06	-0,05	-5,34	-6,22	-4,10	-5,16	-6,92	-6,92				
H	-5,34	3,82	-3,75	-3,40	-3,93	-6,57	-6,40	-7,10				

En las tablas del 21 al 25 se observa los resultados obtenidos al hacer el cálculo del porcentaje M/N, el cual nos indica la presencia o ausencia de anticuerpos del VLB. Las muestras que resultaron < 30 % se consideran Negativas a la presencia de anticuerpos. Las muestras que resultaron superior $\geq 30\%$ a <40% se consideran Dudosos. Las muestras que resultaron $\geq 40\%$ se consideran positivos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las tablas concluimos que; cuantitativamente en la comunidad de Ccolcca de 205 vacunos muestreados resultaron 2 positivos, en la comunidad de Andamayo de 55 vacunos muestreados ninguno resulto positivo y en la comunidad de Lauramarca de 168 vacunos muestreados resultaron 8 vacunos positivos.

Tabla 26. N° de muestras positivas y negativas a anticuerpos contra la LEB en las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Resultados	Comunidades Campesinas			
	Andamayo	Ccolcca	Lauramarca	Total
Positivo	0	2	8	10
Negativo	55	203	160	418
N° de muestras	55	205	168	428

En la tabla 26 se observa que de 205 vacunos evaluados en la comunidad de Ccolcca, 2 vacunos son positivos y 203 son negativos al VLB. De la misma forma tenemos que de los 55 vacunos evaluados en la comunidad de Andamayo, los 55 son negativos al VLB y que de los 168 vacunos evaluados en la comunidad de Lauramarca, 8 vacuno son positivos y 160 son negativos al VLB. Estos resultados nos brindan el diagnóstico definitivo de los vacunos que presentan anticuerpos frente al VLB.

Tabla 27. N° de muestras positivas y negativas a anticuerpos contra la LEB de acuerdo a la edad en las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Comunidades Campesinas	N° de muestras	Edad					Total
		DL	2D	4D	6D	BLL	
Ccolcca	205	1	0	0	0	1	2
Andamayo	55	0	0	0	0	0	0
Lauramarca	168	3	0	0	1	4	8
Subtotal		4	0	0	1	5	10

En la tabla 27 se observa que de los 205 vacunos muestreados en la comunidad de Ccolcca, 1 vacuno que resulto positivo es de BLL y el otro vacuno es de DL; y que de los 168 vacunos muestreados en la comunidad de Lauramarca, 3 vacunos que resultaron positivos son vacunos DL, 1 vacuno es de 6D y 4 vacunos pertenecientes a la categoría BLL.

4.1.3 Prevalencia de LEB, en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Al realizar el análisis de 205 muestras de la comunidad de Ccolcca, 55 muestras de la comunidad de Andamayo y de 168 muestras de la comunidad de Lauramarca por el método de ELISA indirecta, se determinó la prevalencia del LEB y se obtuvo el siguiente resultado.

Tabla 28. Prevalencia del LEB, en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Comunidad	N° de muestras	Positivos al LVB	Prevalencia %
Ccolcca	205	2	0.97± 0.13
Andamayo	55	0	0.00± 0.00
Lauramarca	168	8	4.76±0.32
TOTAL	428	10	2.34±0.14

En la tabla 28, se observó la prevalencia del LEB, en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca es de 0.97±0.13%(2/205), 0.00± 0.00% (0/55) y 4.76±0.32% (8/168) respectivamente. Podemos observar diferencias significativas en cuanto al variable sector, la comunidad de

Lauramarca presenta una mayor prevalencia a comparación de las otras comunidades, esto se puede deber a que los productores de dicha comunidad son participes en ferias agropecuarias, por consecuencia los animales se encuentran más propensos a adquirir el virus.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron 10 casos positivos con una prevalencia de $2.34 \pm 0.14\%$ (10/428) para las comunidades de Andamayo, Ccolcca y Lauramarca.

En el estudio realizado por Flores & Rivera, 2000. Valle de Arequipa en el sur de Perú, utilizando la prueba ELISA indirecta, obtuvieron prevalencias de 12,8% (52/410), con el 14,6% (38/261) de los rebaños infectados. Cuyo resultado es superior al presente trabajo de investigación. Esta diferencia se puede deber a que en la zona de estudio de dicho autor, existe alta diseminación de la enfermedad.

Úsuga et al., (2015). Colombia, por prueba de PCR identificó un total de 219 vacas positivas a LBE de las 500 muestreadas, equivalente al 44 % de infección. En comparación con el presente trabajo tienden a ser valores superiores a lo que se determinó en las comunidades de Andamayo, Ccolcca y Lauramarca, dicha diferencia puede atribuirse a que dichos autores utilizaron la prueba de PCR, la cual es más específica y sensible frente a la prueba serológica de ELISA.

Tabla 29. Prevalencia de la LEB, según la edad en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Comunidad Edad	CCOLCCA	ANDAMAYO	LAURAMARCA	PREVALENCIA %
DL	1	0	3	3.07±0.29
2D	0	0	0	0±0
4D	0	0	0	0±0
6D	0	0	1	3.03±0.59
BLL	1	0	4	2.60±0.22
TOTAL	2	0	8	2.34±0.14

En la tabla 29, la prevalencia de la LEB en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca para vacunos dientes de leche es de 3.07±0.29%(4/130), para vacunos de 2 dientes es de 0±0 %(0/29), para vacunos de 4 dientes es de 0±0%(0/44), para vacunos de 6 dientes es de 3.03±0.59%(1/33) y para vacunos de boca llena es de 2.60±0.022%(5/192). Podemos observar que la prevalencia en la categoría DL Y 6D son más altas a comparación de las otras en mención.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fue 10 casos positivos con una prevalencia de 2.34±0.14%(10/428). Este resultado difiere con el trabajo que realizaron Nava *et al.*, 2011.Venezuela. Encontraron prevalencias según grupo etario de 1 a 4 años, 47 de 97 (21,56%), resultaron seropositivos, mientras que el grupo ≥5 años, 172 de 262 (65,65%) fueron positivos a la prueba serológica, mostrando diferencias significativas (P=0,0030). Esta diferencia se puede deber a que en la zona de estudio de dicho autor, existe una fuerte actividad viral.

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante la prueba de ELISA Indirecta en vacunos de las comunidades campesinas de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca, distrito de Ocongate, provincia Quispicanchi, departamento del Cusco, indican la existencia de vacunos portadores de la enfermedad, los cuales son los focos de diseminación de la Leucosis Bovina.

Tabla 30. Prevalencia de la LEB, según sexo en vacunos de la comunidad de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

Comunidad Sexo	CCOLCCA	ANDAMAYO	LAURAMARCA	PREVALENCIA %
HEMBRA	1	0	7	2.12±0.15
MACHO	1	0	1	3.84±0.52
TOTAL	2	0	8	2.34±0.14

En la tabla 30, la prevalencia de LEB en vacunos de las comunidades de Ccolcca, Andamayo y Lauramarca respecto al sexo el 2.12±0.15(8/376) fueron hembras y 3.84±0.52(2/52) fueron machos. Este resultado difiere con el trabajo que realizó Fabián, 2014.Trujillo, utilizando el método de observación directo de los órganos y carcasa. Reporto una prevalencia con respecto al sexo del total de casos diagnosticados 8 fueron hembras y 1 macho, que representa 88.9% y 11.1% respectivamente, resultados que son superiores al presente trabajo. La prevalencia en vacunos machos se muestra más alta debido a que el número de muestras es mínima a comparación de las hembras, pero consecuentemente existen más vacunos hembras que poseen el virus. De acuerdo a Chamizo (2005) en las razas de ganado de leche la presencia de la enfermedad es mayor que en ganados de engorde, debido a la mayor

exposición de estos animales a fuentes de infección como agujas de vacunas, material quirúrgico, guantes de palpación, entre otros.

4.1.4 Identificación del Virus de la Leucosis Bovina (VLB).

Se trabajó con el material genético de los animales negativos y se analizó mediante PCR - tiempo real, usando primers específicos para la detección VLB.

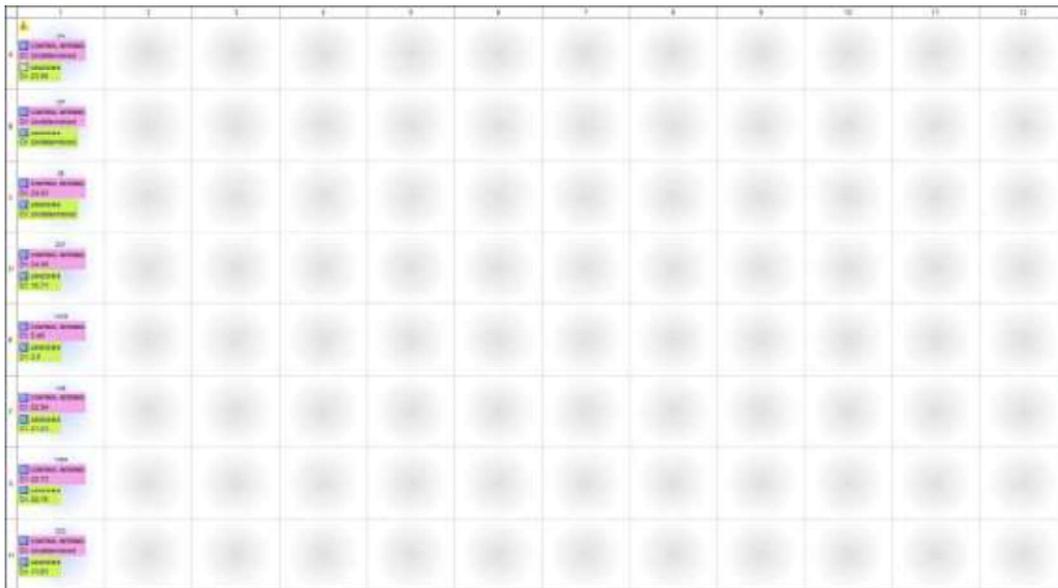


Figura 4: Configuración de la placa experimental para Leucosis Bovina de las comunidades Ccolcca, Andamayo y Lauramarca.

En las figuras 4, se observa la distribución de los controles (*/-) y las muestras en la placa experimental.

En las figuras 5, se observa la configuración de los ciclos, tiempos y las temperaturas para la amplificación del LVB en base al protocolo.

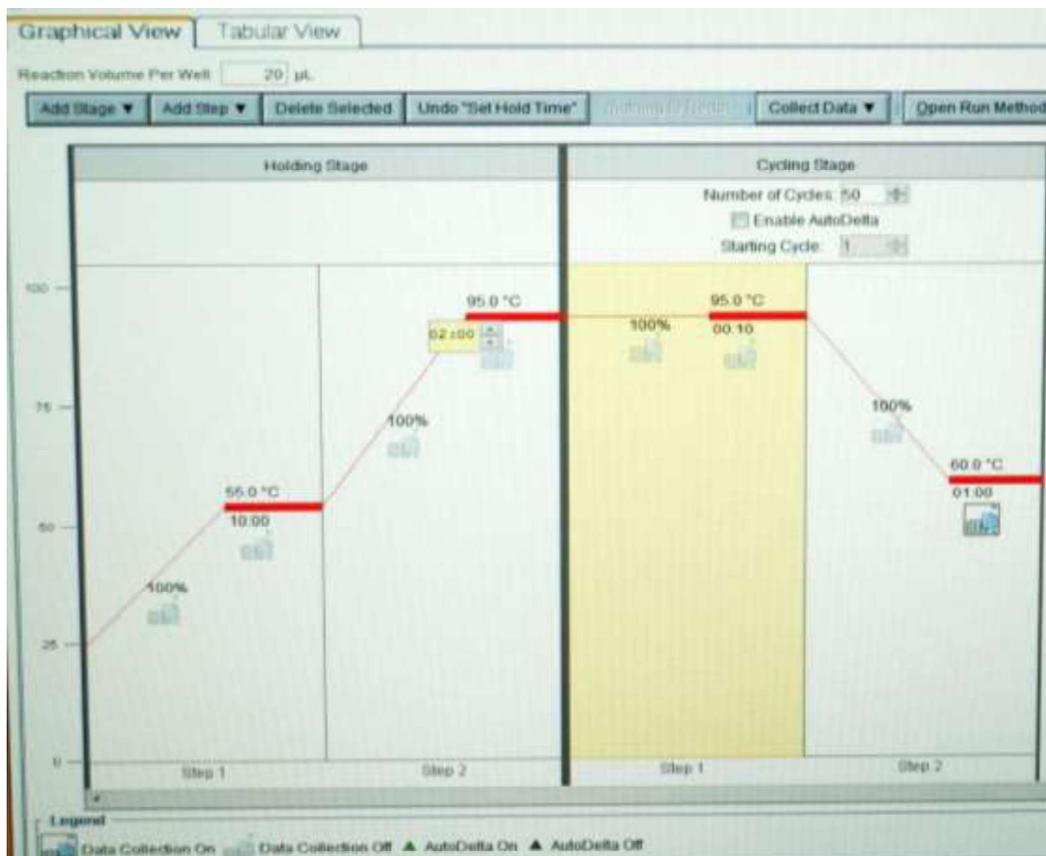


Figura 5: Configuración de los ciclos, tiempos y temperaturas para la amplificación del VLB por PCR en tiempo real.

En la figura 6, se observan un total de 6 muestras de vacunos evaluados, donde 1 es muestra de la comunidad de Andamayo, 3 son muestras de la comunidad de Ccolcca, 2 son muestras de la comunidad de Lauramarca, las 6 muestras evaluadas resultaron ser positivas. La observación de los resultados de la amplificación, se consideró como positivo a la onda de la muestra que se levanta junto a la onda del control positivo y la onda del control negativo se debe mostrar de forma lineal (sin presentar señal), la validación de los resultados se dio con el valor del Ct.

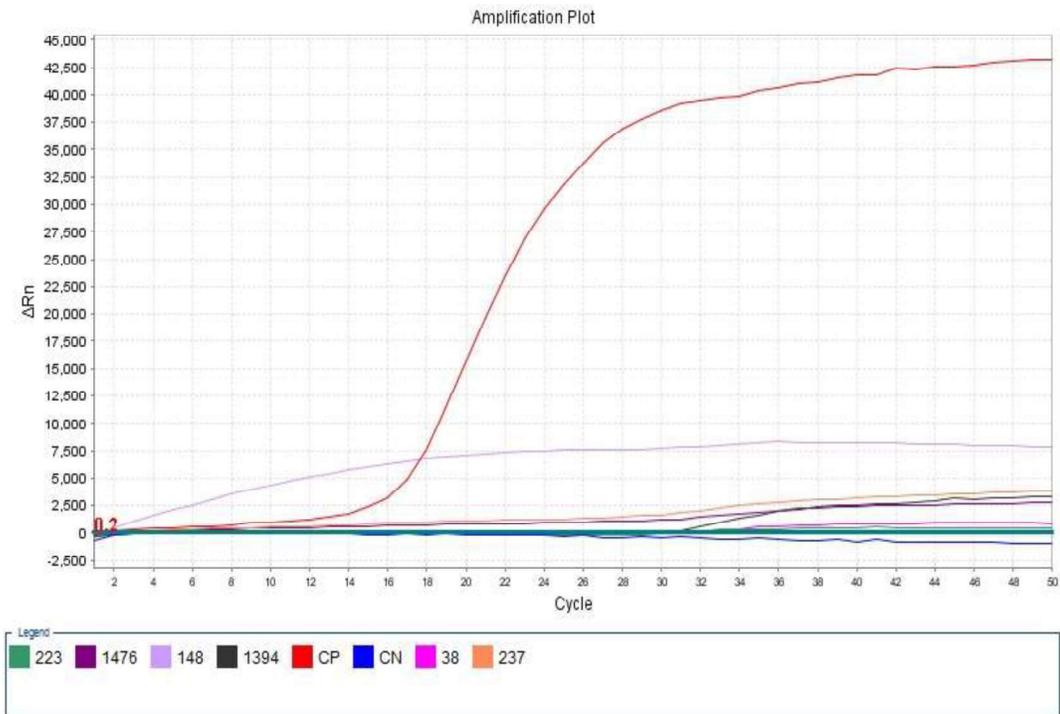


Figura 6: Resultado de la amplificación de las muestras positivas al VLB.

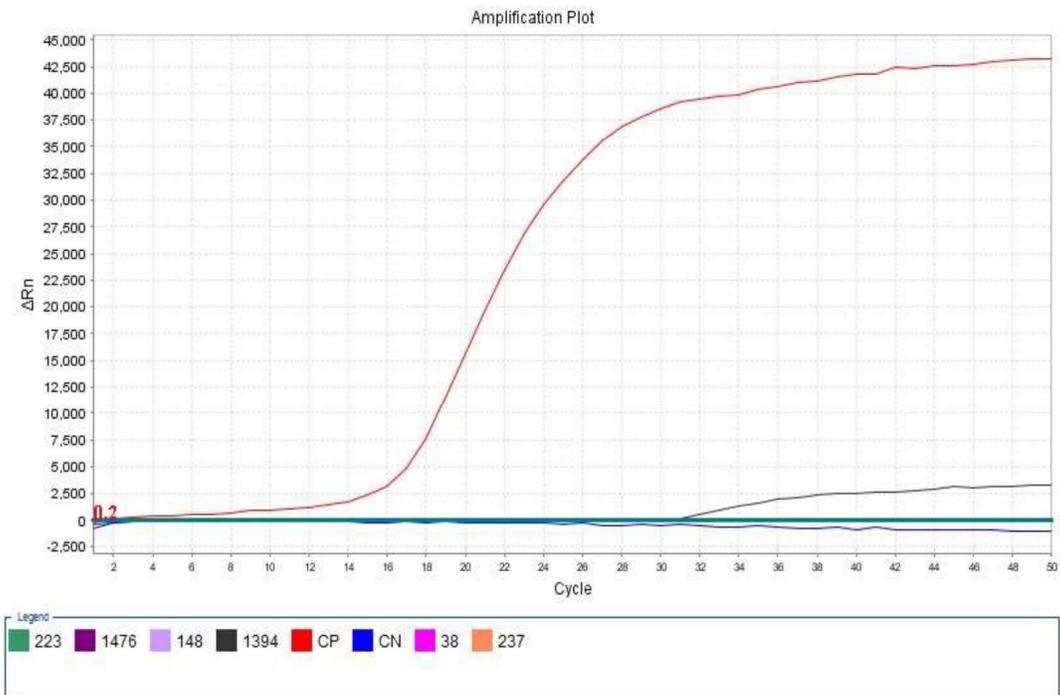


Figura 7: Resultado de la muestra N° 1394 para la identificación del VLB perteneciente a la comunidad de Ccolcca.

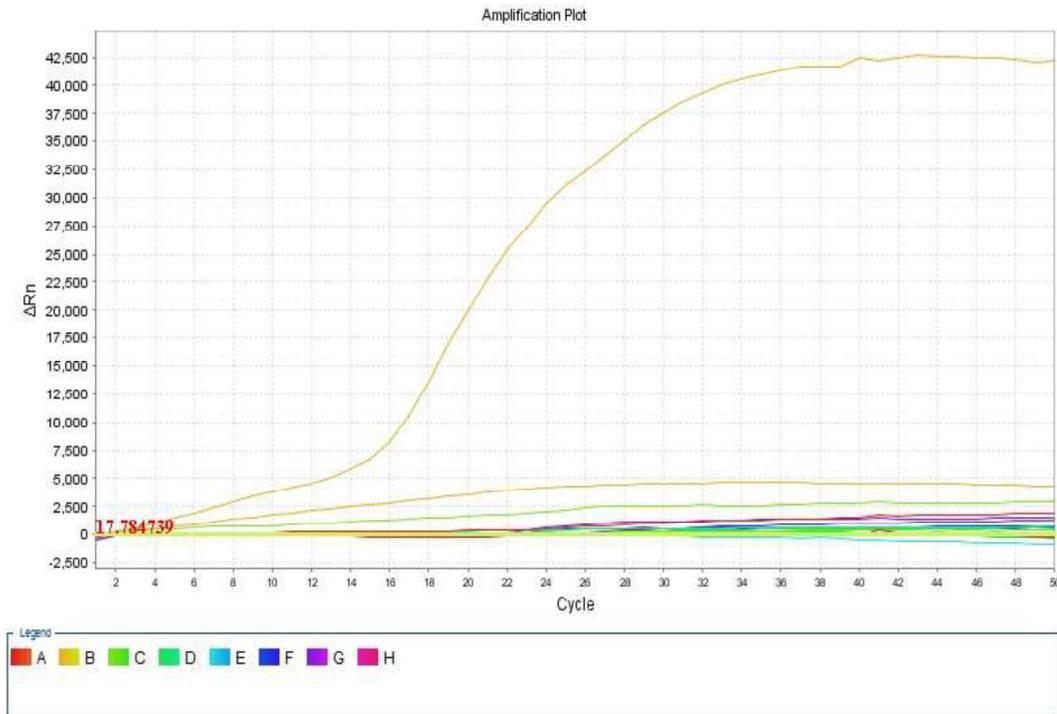


Figura 8: Resultado de la amplificación de las muestras positivas y control interno.

En la figura 7, se observa la amplificación de la muestra N°1394 perteneciente a la comunidad campesina de Ccolcca teniendo un Ct (Ciclo umbral) de 20.761 y un Ct de control positivo de 23.601.

En la figura 8, se muestra la amplificación de las seis muestras, de los controles (+/-) y paralelamente de los controles internos por cada muestra.

El control interno se detecta a través del canal VIC y es ventajoso ya que esta determina la calidad del material biológico. La fluorescencia de los controles internos, nos indica que los inhibidores de la PCR no están presentes en una concentración alta.

Tabla 31 Valor del Ct (Ciclo umbral) de las muestras, control positivo, control negativo para el VLB.

Nº MUESTRAS	Ct
Tarjeta: Control Interno (VIC)	
1394	22.7301
1476	15.4913
148	22.8356
223	20.9147
237	24.0897
38	24.029
CN	-
CP	20.0971
Tarjeta: Leucosis Bovina (FAM)	
1394	20.7615
1476	15.1307
148	26.2279
223	28.9147
237	15.7061
38	30.029
CN	-
CP	23.601

En la tabla 31 se observa las muestras 38 Andamayo, 148 Ccolcca, 223 Ccolcca, 237 Ccolcca, 1394 Lauramarca, 1476 Lauramarca, cuyos Ct (Ciclo umbral) del VLB son, 30.029, 26.2279, 28.9147, 15.7061, 20.7615 y 15.1307 respectivamente; el Ct del control positivo es de 23. 601 y el Ct del control negativo no presenta señal. Los mismos, nos indican a que nivel se replica el virus de la Leucosis Bovina. Asimismo se observa los Ct del control interno por cada muestra. Los cuales son la base para una buena interpretación. Por consiguiente, los resultados obtenidos confirman la presencia del virus en seis

vacunos, los cuales fueron serológicamente negativas a la Prueba de ELISA Indirecta. Según el estudio realizado por Úsuga et al., (2015) en Colombia, la PCR identificó un total de 219 vacas positivas a VLB de las 500 muestreadas, equivalente al 44 % de infección en el departamento de Antioquía. Dicha diferencia puede deberse al lugar de origen de las muestras que está altamente relacionada con la presencia del agente infeccioso. Según otro estudio realizado por Sandoval et al., (2015) en Lima, mediante la prueba de ELISA, se identificó una prevalencia del 92.7% (51/55). Dicha diferencia puede deberse al lugar de origen de las muestras, el alto grado de manipulación de los animales y a la omisión de algunas prácticas de bioseguridad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. La prevalencia de la LEB según edad se observa que los bovinos más afectados corresponden a los bovinos mayores a 6 años con $2.60 \pm 0.22\%$ (5/193). Según al sexo se observa que los bovinos hembras son más susceptibles con un $2.12 \pm 0.15\%$ (8/428) de la presencia de anticuerpos contra el VLB.
2. En forma interesante, la prueba de PCR en suero sanguíneo identificó seis muestras positivas, que, sin embargo, fueron negativas en la prueba serológica empleada, lo que sugiere que si existe la presencia del VLB; e implica la existencia de animales portadores o que están por enfermar.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Concientizar a los productores sobre la importancia de la LEB, respecto a la salud animal y los perjuicios que ocasionan en la producción de vacunos.
2. Eliminar a los vacunos infectados con el virus de la Leucosis Bovina, ya que son los focos de diseminación, pero de no ser posible, se deben mantener separados de los negativos, evitando cualquier contacto entre ellos.
3. Aplicar las normas de bioseguridad en todo el establo para prevenir la contaminación.
4. Cuando exista la introducción de nuevos bovinos al establo, se debe aplicar medidas cuarentenarias para evitar una posible transmisión.
5. Como también se debe implementar estrategias de control y prevención para los vacunos de las comunidades de Ccolcca y Lauramarca, distrito de Ocongate, Provincia de Quispicanchis. Se debe adoptar prácticas de manejo dirigidas a reducir la diseminación de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrera Ancco, M. L. (2010). "Seroprevalencia de Leucosis Viral Bovina (LVB) en el Valle Viejo del Distrito de Moquegua, 2010." Retrieved from http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1028/TM184_Mamani_Aguilar_G.pdf?sequence=1&isAllowed=y%0Ahttp://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/01040500703.pdf
- Baruta, D. A., Ardonio, S. M., Brandan, J. L., Sosa, R. E., Mariani, E. L., & Albretch, E. . (2005). Leucosis Bovina Enzoótica. *Redvet*, VI, 25. Retrieved from <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070505.html>
- Benavides Benavides, B., Cedeño Quevedo, D. A., & Serrano De La Cruz, M. F. (2013). Epidemiological study of bovine leukemia virus in dairy cows in six herds in the municipality of Pasto , Nariño *, 10(1), 1–26. Retrieved from bibibenavides@gmail.com
- Casas Olascoaga, R. (2014). Leucosis bovina enzoótica.
- Castelli M, Manzini V, (2001). Leucosis Enzoótica Bovina: Evolución de la infección en hembras Holando Argentino. 24 Congreso Argentino de Producción Animal. Rafaela, 19 al 21de septiembre de 2001
- Chamizo, P. (2005). Leucosis Bovina. Revista electronica de veterinaria *Red Vet ISSN*, 1695-7504.
- Cultek. (2006). Fundamentos y Tipos de ELISAs. Retrieved from www.cultek.com
- De loannes, A. Reacciones Antigeno - Anticuerpo (2007).

- De Souza Rajão, Daniela (2008). Efecto de la infección por el virus de la Leucosis Enzootica Bovina en la producción de leche y reproducción de rebaños lecheros, 1–26.
- Fabián Rodríguez, L. M. (2013). Frecuencia de Linfomatosis Bovina en el camal municipal del Distrito el Porvenir, Trujillo-Peru 2013.
- Felmer, R., Zúñiga, J., & Recabal, M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado , ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero , sangre y leche. Comparative study of nested PCR , ELISA and AGID tests in the detection of bovine- leukaemia virus infection in ser. *Arch. Med. Vet.*, 38, 137–141. Retrieved from rfelmer@inia.cl
- Fernández S., P., Díaz S., P., & Cañedo F., V. (2004). Medidas de frecuencia de enfermedad, (1), 1–6. Retrieved from www.fisterra.com
- Flores A., A., & Rivera G., H. (2000). Seroprevalencia del Virus de Leucosis Bovina en la Cuenca lechera de Arequipa. *Rev Inv Vet Perú*, 11(2), 144–148. Retrieved from d/70029@unmsm.edu.pe
- Grajales Quintero, K. M. (2011). Leucosis Enzootica Bovina, 1–24.
- <http://censos.inei.gob.pe/cenagro/tabulados/-Censo Agropecuario 2012>
- <http://infolactea.com/wp-content/uploads/2015/03/692.pdf> 2012
- J.R. Romero, L. V. (2009). Impacto económico de enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamerica. 1-14.
- Modena Lopez, E. (2007). Seroprevalencia de leucosis viral bovina en la Provincia de Leoncio Prado.

- Moreno Altamirano, A., López Moreno, S., & Corcho Berdugo, A. (2000).
Principales medidas en epidemiología. En *Salud Pública de México*
(págs. 1-12).
- Nava, Z., Obando, C., Molina, M., Bracamonte, M., & Tkachuk, O. (2011).
Seroprevalencia de la Leucosis Enzoótica Bovina y su Asociación con
Signos Clínicos y Factores de Riesgo en Rebaños Lecheros del Estado
Barinas, Venezuela, 1–12. Retrieved from zomnav@gmail.com
- ofi5.mef.gob.pe › [appFs](#) › Download - “Mejoramiento de la Oferta de Servicios
Educativos en la I.E. N° 50765 de la Comunidad de Sallicancha, Distrito de
Ocongate, Provincia de Quispicanchi, Departamento de Cusco- Plan de
desarrollo concertado Ocongate, 2012”
- Orrego A., J., Delgado C., A., & Echevarría C., L. (2003). Vida productiva y
principales causas de descarte de vacas holstein en la Cuenca de Lima.
Rev Inv Vet Perú, 14(1), 68–73.
- Panduro, Arturo. (n.d.). Reaccion en Cadena de la Polimeraza (PCR). *Revista
Nature*, 8.
- Quiroz Martínez, M. Á. (2007). Leucosis Viral Bovina.
- Rodriguez S., A. (12 de julio de 2006). Leucosis enzoótica bovina. Recuperado
el 12 de diciembre de 2018, de ABC color:
<http://www.abc.com.py/edicion-impres/suplementos/abc-rural/leucosis-enzootica-bovina-916964.html>
- Romero, J. ., Villamil, L. ., & Pinto, J. . (1999). Impacto económico de
enfermedades animales en sistemas productivos en Sudamérica : estudios

de caso. *Rev. Sci. Tech.*, 18(2), 498–511.

Sandoval R., Delgado A., Ruíz L., & Ramos O.,(2015) Determinación de la seroprevalencia del virus de la Leucemia Bovina en un establo lechero de Lima, Perú. *Rev Inv Vet Perú*,vol. 26, 152–158.

Úsuga Monroy, C., Echeverri, J., & López Herrera, H. (2015). Diagnóstico molecular del virus de leucosis bovina en una población de vacas Holstein , Colombia, 2013(248), 383–388.

Vásconez Hernández, A., Sandoval Valencia, P., Puga Torres, B., & De La Cueva Jácome, F. (2017). Seroprevalencia de Leucosis Enzoótica Bovina en animales entre 6 A 24 meses en las Provincias de Manabí, Pichincha y Chimborazo - Ecuador. *La Granja:Revista de Ciencias de La Vida*, 26(2), 131–141.

ANEXOS

Anexo 1. Cálculos para determinar el tamaño de muestra, comunidad de Andamayo.

$$n = \frac{N * Z^2 p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (p * q)}$$

Dónde:

N: tamaño poblacional

Z: 1.89, nivel de confianza que se da a la muestra

p: animales positivos a LVB 0.5

q: animales negativos a LVB 0.5

E: error experimental 0.06

n: tamaño de muestra

$$n = \frac{70 \times (1.89)^2 (0.5 \times 0.5)}{(70 - 1)(0.06)^2 + (1.89)^2 (0.5 \times 0.5)}$$

$$n = \frac{62.47}{1.14}$$

$$n = 54.7$$

$$n = 55$$

Anexo 2. Cálculos para determinar el tamaño de muestra, comunidad de Ccolcca.

$$n = \frac{N * Z^2 p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (p * q)}$$

Dónde:

N: tamaño poblacional

Z: 1.89, nivel de confianza que se da a la muestra

p: animales positivos a LVB 0.5

q: animales negativos a LVB 0.5

E: error experimental 0.06

n: tamaño de muestra

$$n = \frac{1160 \times (1.89)^2 (0.5 \times 0.5)}{(1160 - 1)(0.06)^2 + (1.89)^2 (0.5 \times 0.5)}$$

$$n = \frac{1035.3}{5.06}$$

$$n = 204.6$$

$$n = 205$$

Anexo 3. Cálculos para determinar el tamaño de muestra, comunidad de Lauramarca.

$$n = \frac{N * Z^2 p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (p * q)}$$

Dónde:

N: tamaño poblacional

Z: 1.89, nivel de confianza que se da a la muestra

p: animales positivos a LVB 0.5

q: animales negativos a LVB 0.5

E: error experimental 0.06

n: tamaño de muestra

$$n = \frac{523 \times (1.89)^2 (0.5 \times 0.5)}{(523 - 1)(0.06)^2 + (1.89)^2 (0.5 \times 0.5)}$$

$$n = \frac{466.77}{2.77}$$

$$n = 168$$

Anexo 4. Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para Leucosis Bovina, comunidad de Andamayo.

N°	Nombre del Productor	N° Muestra	Nombre/ Vacuno	Sexo	Raza	Edad	N° Partos	Participa en Ferias	Densidad Óptica	M/N%	Diagnostico
1	Lucia Gonzales Jancco	1	Pastora	Hembra	Brown Swiss	1A	0	No	0,046	-7,923	Negativo
2	Lucia Gonzales Jancco	2	Aurora	Hembra	Brown Swiss	1A	0	No	0,056	-6,911	Negativo
3	Lucia Gonzales Jancco	3	Shiomara	Hembra	Brown Swiss	4A 9M	2	No	0,043	-8,322	Negativo
4	Domingo Hunaca	4	Minerva	Hembra	Brown Swiss	5A 10M	3	Si	0,043	-8,236	Negativo
5	Domingo Hunaca	5	Atenea	Hembra	Brown Swiss	4A 5M	1	Si	0,042	-8,408	Negativo
6	Máximo Huanca Luna	6	Empe	Hembra	Brown Swiss	6A	4	Si	0,059	-6,588	Negativo
7	Máximo Huanca Luna	7	Lola	Hembra	Brown Swiss	2A 7M	0	Si	0,043	-8,279	Negativo
8	Máximo Huanca Luna	8	Huayruro	Hembra	Brown Swiss	2A 3M	0	Si	0,044	-8,171	Negativo
9	Máximo Huanca Luna	9	Peggy	Hembra	Brown Swiss	6A 9M	2	Si	0,042	-8,365	Negativo
10	Maximo Huanca Luna	10	Katy Junior	Hembra	Brown Swiss	1A 6M	0	Si	0,054	-7,094	Negativo
11	Maximo Huanca Luna	11	Urpi	Hembra	Brown Swiss	11M	0	Si	0,043	-8,322	Negativo
12	Maximo Huanca Luna	12	Linda	Hembra	Hibrido	1A 3M	0	No	0,043	-8,311	Negativo
13	Maximo Huanca Luna	13	Quina	Hembra	Brown Swiss	1A 10M	0	No	0,043	-8,311	Negativo
14	Maximo Huanca Luna	14	Katy Mama	Hembra	Brown Swiss	8A	4	No	0,041	-8,494	Negativo
15	Hilario Merma	15	Coral	Hembra	Brown Swiss	4A 10M	2	Si	0,044	-8,182	Negativo
16	Hilario Merma	16	Yola	Hembra	Brown Swiss	3A 6M	1	No	0,049	-7,654	Negativo
17	Hilario Merma	17	Udila	Hembra	Brown Swiss	4A 4M	2	No	0,045	-8,117	Negativo
18	Hilario Merma	18	Rosita	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,045	-8,106	Negativo
19	Vicente Sallo	19	Flor	Hembra	Brown Swiss	4A	1	No	0,042	-8,397	Negativo
20	Vicente Sallo	20	Yuli	Hembra	Brown Swiss	7A	5	No	0,049	-7,633	Negativo
21	Vicente Sallo	21	Rubia	Hembra	Hibrido	2A	0	No	0,047	-7,837	Negativo

22	Vicente Sallo	22	Katya	Hembra	Brown Swiss	1A 8M	0	No	0,043	-8,311	Negativo
23	Bernabe Merma Choque	23	Mata Sumara	Hembra	Brown Swiss	8A	4	No	0,043	-8,3	Negativo
24	Bernabe Merma Choque	24	Shamarita	Hembra	Brown Swiss	7A	4	No	0,047	-7,848	Negativo
25	Porfirio Sallo	25	Fani	Hembra	Brown Swiss	6A	4	No	0,046	-7,977	Negativo
26	Porfirio Sallo	26	Susa	Hembra	Brown Swiss	5A 2M	3	No	0,043	-8,332	Negativo
27	Porfirio Sallo	27	Rubi	Hembra	Brown Swiss	1A 6M	0	No	0,041	-8,494	Negativo
28	Porfirio Sallo	28	Jhon	Macho	Brown Swiss	1A	0	No	0,046	-8,009	Negativo
29	Mercedes Quispe Gonzales	29	Mary	Hembra	Brown Swiss	5A	2	No	0,042	-7,837	Negativo
30	Mercedes Quispe Gonzales	30	Saq'ra	Hembra	Brown Swiss	1A 4M	0	No	0,044	-8,311	Negativo
31	Juliana Mamani Yucre	31	Micaela	Hembra	Brown Swiss	3A 6M	1	Si	0,046	-8,3	Negativo
32	Juliana Mamani Yucre	32	Dina	Hembra	Brown Swiss	8A	4	No	0,044	-7,848	Negativo
33	Juliana Mamani Yucre	33	Wayra	Hembra	Brown Swiss	1A 6M	0	No	0,044	-7,977	Negativo
34	Juliana Mamani Yucre	34	Martha	Hembra	Brown Swiss	4A 11M	2	Si	0,047	-8,332	Negativo
35	Dilia Chilihuanu Yapura	35	Lola	Hembra	Brown Swiss	2A 8M	0	No	0,102	-8,494	Negativo
36	Dilia Chilihuanu Yapura	36	Katy	Hembra	Brown Swiss	1A 5 M	0	No	0,078	-8,009	Negativo
37	Dilia Chilihuanu Yapura	37	Urpi	Hembra	Brown Swiss	11M	0	No	0,043	-8,268	Negativo
38	Dilia Chilihuanu Yapura	38	Quinua	Hembra	Brown Swiss	3A 7M	1	No	0,041	-8,483	Negativo
39	Stevan Quispe Merma	39	Rubia	Hembra	Brown Swiss	8A	5	No	0,042	-8,44	Negativo
40	Stevan Quispe Merma	40	Micaela	Hembra	Brown Swiss	2A 6M	0	No	0,041	-8,483	Negativo
41	Stevan Quispe Merma	41	Canela	Hembra	Brown Swiss	5A 8M	2	No	0,045	-8,117	Negativo
42	Stevan Quispe Merma	42	Flora	Hembra	Brown Swiss	1A	0	No	0,043	-8,289	Negativo
43	Stevan Quispe Merma	43	Rosa	Hembra	Brown Swiss	2A 5M	0	No	0,048	-7,805	Negativo
44	Stevan Quispe Merma	44	Lara	Hembra	Brown Swiss	9M	0	No	0,041	-8,559	Negativo
45	Stevan Quispe Merma	45	Anita	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,043	-8,3	Negativo
46	Santos Merma	46	Lucila	Hembra	Brown Swiss	6A 2M	5	Si	0,043	-8,311	Negativo
47	Santos Merma	48	Sonia	Hembra	Brown Swiss	4A	1	No	0,043	-8,268	Negativo

48	Santos Merma	50	Lidiana	Hembra	Brown Swiss	1A	0	No	0,042	-8,386	Negativo
49	Santos Merma	49	Benita	Hembra	Brown Swiss	1A 8M	0	No	0,043	-8,268	Negativo
50	Juan Merma Yucra	55	Yulisa	Hembra	Brown Swiss	11M	0	No	0,046	-8,009	Negativo
51	Juan Merma Yucra	54	Sabina	Hembra	Brown Swiss	2A 5M	0	Si	0,067	-5,684	Negativo
52	Juan Merma Yucra	53	Rusa	Hembra	Brown Swiss	5A 4M	2	Si	0,043	-8,343	Negativo
53	Juan Merma Yucra	52	Amelia	Hembra	Brown Swiss	8A	5	Si	0,042	-8,44	Negativo
54	Juan Merma Yucra	56	Chaska	Hembra	Brown Swiss	1A	0	No	0,044	-8,214	Negativo
55	Juan Merma Yucra	51	Morita	Hembra	Brown Swiss	1A 2M	0	No	0,048	-7,73	Negativo

Anexo 5. Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para Leucosis Bovina, comunidad de Ccolcca.

N°	Nombre del Productor	N° Muestra	Nombre/ Vacuno	Sexo	Raza	Edad	N° Partos	Participa en Ferias	Densidad Óptica	M/N%	Diagnostico
1	Sandra sulcapuma	57	Yaguar	Macho	Brown Swiss	9M	0	No	0,044	-8,203	Negativo
2	Sandra sulcapuma	58	Manuel	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,114	-0,678	Negativo
3	Sandra sulcapuma	59	Bronco	Macho	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,064	-6,061	Negativo
4	Sandra sulcapuma	60	Dina	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,048	-7,794	Negativo
5	Sandra sulcapuma	61	China	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,043	-8,236	Negativo
6	Sandra sulcapuma	62	Blanca	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	Si	0,043	-8,322	Negativo
7	Sandra sulcapuma	63	Chaska	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,041	-8,515	Negativo
8	Raul Corimanya	64	Naranjita	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,045	-8,096	Negativo
9	Raul Corimanya	65	Yoba	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	5	No	0,045	-8,042	Negativo
10	Raul Corimanya	66	Shamil	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	3	No	0,047	-7,913	Negativo
11	Raul Corimanya	67	Milagros	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	5	No	0,042	-8,44	Negativo
12	Leoncio Corimanya	68	Rosi	Hembra	Brown Swiss	14 ^a	9	No	0,047	-7,913	Negativo

13	Leoncio Corimanya	69	Juanita	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,051	-7,396	Negativo
14	Leoncio Corimanya	70	Florcita	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,043	-8,279	Negativo
15	Leoncio Corimanya	71	Bitti	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	5	No	0,042	-8,386	Negativo
16	Flavia Luna Yana	76	Tafaril	Macho	Brown Swiss	10M	0	No	0,043	-8,3	Negativo
17	Flavia Luna Yana	77	Dina	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,043	-8,257	Negativo
18	Flavia Luna Yana	78	Waquita	Hembra	Brown Swiss	7M	0	No	0,043	-8,279	Negativo
19	Flavia Luna Yana	79	Nadine	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,045	-8,106	Negativo
20	Flavia Luna Yana	80	Quina	Hembra	Brown Swiss	11M	0	No	0,053	-7,159	Negativo
21	Flavia Luna Yana	81	Negrta	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,048	-7,708	Negativo
22	Flavia Luna Yana	82	Pucacha	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	Si	0,056	-6,868	Negativo
23	Maria Tapia	83	Chana	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,041	-8,472	Negativo
24	Valentin Quispe	84	Vaquito	Macho	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,05	-7,536	Negativo
25	Leoncio Corimanya	85	Sony	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,048	-7,73	Negativo
26	German Turpo	86	Mamisha	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,05	-7,579	Negativo
27	German Turpo	87	Flor	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	No	0,111	-0,969	Negativo
28	German Turpo	88	Juanita	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	2	No	0,061	-6,362	Negativo
29	German Turpo	89	Erick	Macho	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,045	-8,117	Negativo
30	Julia Turpo Suclli	90	Yandira	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,043	-8,257	Negativo
31	Miluska Nina Huaman	91	Chana	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,095	-2,67	Negativo
32	Julia Turpo Suclli	92	Juan	Macho	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,053	-7,234	Negativo
33	Julia Turpo Suclli	93	Negra	Hembra	Brown Swiss	16 ^a	12	No	0,067	-5,716	Negativo
34	Angelino Huanco	94	Kinkon	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,097	-2,433	Negativo
35	Irene Puma	95	Rosa	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	6	No	0,044	-8,182	Negativo
36	Irene Puma	96	Alian	Macho	Brown Swiss	9M	0	No	0,046	-7,966	Negativo
37	Irene Puma	97	Rosa	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	6	No	0,046	-7,999	Negativo
38	Luciano Sulcapuma Mayu	100	Macarina	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	4	No	0,069	-8,164	Negativo
39	Ismael Luna Quispe	101	Charles	Hembra	Holstein	6 ^a	4	No	0,060	-9,207	Negativo

40	Julia Turbo Suclli	102	Maria	Hembra	Holstein	1 ^a	0	No	0,059	-9,323	Negativo
41	Julia Turbo Suclli	103	Yamina	Hembra	Holstein	1 ^a	0	No	0,059	-9,323	Negativo
42	Vicentina Quispe Gonzalo	104	Coca	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	Si	0,05	-10,36	Negativo
43	Vicentina Quispe Gonzalo	105	Rusi	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	5	Si	0,081	-6,775	Negativo
44	Vicentina Quispe Gonzalo	106	Paloma	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	2	Si	0,156	1,911	Negativo
45	Vicentina Quispe Gonzalo	107	Prinusa	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,131	-0,984	Negativo
46	Vicentina Quispe Gonzalo	108	Yurima	Hembra	Brown Swiss	9 ^a	7	Si	0,059	-9,323	Negativo
47	Vicentina Quispe Gonzalo	109	Sandra	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	Si	0,056	-9,670	Negativo
48	Eduardo Corimanya Turpo	110	Catalina	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,053	-10,01	Negativo
49	Eduardo Corimanya Turpo	111	Nayda	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	5	No	0,068	-8,280	Negativo
50	Yolanda Merma Chillihuana	112	Florcita	Hembra	Brown Swiss	9M	0	Si	0,051	-10,24	Negativo
51	Celia Quispe Turpo	113	Rosa	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	4	No	0,117	-2,606	Negativo
52	Valvina Luna Llano	114	Kena	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	No	0,086	-6,196	Negativo
53	Esteban Sulcapuma Contreras	115	Azumi	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	No	0,073	-7,701	Negativo
54	Esteban Sulcapuma Contreras	116	Chita	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	No	0,081	-6,775	Negativo
55	Esteban Sulcapuma Contreras	117	Flor de Maria	Hembra	Hibrido	2 ^a	1	No	0,053	-10,01	Negativo
56	Esteban Sulcapuma Contreras	118	Paty	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	3	No	0,056	-9,670	Negativo
57	Esteban Sulcapuma Contreras	119	Sulluqucha	Hembra	Hibrido	6M	0	No	0,058	-9,438	Negativo
58	Juan Turpo Yucrea	120	Eufemia	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,075	-7,470	Negativo
59	Juan Turpo Yucrea	121	Mestiza	Hembra	Hibrido	2 ^a	0	No	0,079	-7,006	Negativo
60	Juan Turpo Yucrea	122	Mestiza II	Hembra	Brown Swiss	1A 6M	0	No	0,055	-9,786	Negativo
61	Juan Turpo Yucrea	123	Amely	Hembra	Brown Swiss	12 ^a	5	No	0,07	-8,049	Negativo
62	Juan Turpo Yucrea	124	Mestiza III	Hembra	Brown Swiss	11M	0	No	0,101	-4,459	Negativo
63	Simon Crispin Turpo	125	Simba	Macho	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,066	-8,512	Negativo

64	Hilaria Chillihuani Garcia	126	Rosy	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	4	No	0,057	-9,554	Negativo
65	Hilaria Chillihuani Garcia	127	Katy	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	6	No	0,056	-9,670	Negativo
66	Hilaria Chillihuani Garcia	128	Florcita	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,123	-1,911	Negativo
67	Hilaria Chillihuani Garcia	129	Blanca	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	4	No	0,076	-7,354	Negativo
68	Hilaria Chillihuani Garcia	130	Lola	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	No	0,078	-7,122	Negativo
69	Hilaria Chillihuani Garcia	131	Tania	Hembra	Brown Swiss	1A 1M	0	No	0,054	-9,902	Negativo
70	Porfirio Roca Turpo	132	Yanet	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,083	-6,543	Negativo
71	Porfirio Roca Turpo	133	Lucero	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	0	No	0,074	-7,585	Negativo
72	Porfirio Roca Turpo	134	Sonia	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,076	-7,354	Negativo
73	Porfirio Roca Turpo	135	Nana	Hembra	Brown Swiss	1A5M	0	No	0,071	-7,933	Negativo
74	Porfirio Roca Turpo	136	Dominga	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,087	-6,080	Negativo
75	Miguel Rocce Turpo	137	Quillabamba	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,059	-9,323	Negativo
76	Miguel Rocce Turpo	138	Lerca	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,084	-6,427	Negativo
77	Porfirio Roca Turpo	139	Sonia	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	2	No	0,063	-8,859	Negativo
78	Catalina Crispin Condori	140	Toro Leon	Macho	Brown Swiss	6 ^a	0	No	0,066	-8,512	Negativo
79	Catalina Crispin Condori	141	Mica	Hembra	Brown Swiss	1A 3M	0	Si	0,081	-6,775	Negativo
80	Catalina Crispin Condori	142	Soni	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	Si	0,054	-9,902	Negativo
81	Catalina Crispin Condori	143	Yesenia	Hembra	Brown Swiss	8M	0	Si	0,149	1,100	Negativo
82	Catalina Crispin Condori	144	Cornito	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	5	Si	0,091	-5,617	Negativo
83	Catalina Crispin Condori	145	Betty	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,207	7,817	Negativo
84	Catalina Crispin Condori	146	Sila	Hembra	Brown Swiss	1A 6M	0	Si	0,101	-4,459	Negativo
85	Catalina Crispin Condori	147	Ollar Hueco	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,126	-1,563	Negativo
86	Catalina Crispin Condori	148	Rosy	Hembra	Brown Swiss	12 ^a	7	Si	0,094	-5,269	Negativo
87	Maxima Mamani Yuca	149	Maria	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,055	-9,786	Negativo
88	Maxima Mamani Yuca	150	Jersey	Macho	Brown Swiss	6M	0	No	0,076	-7,354	Negativo

89	Maxima Mamani Yucra	151	Vosh	Macho	Brown Swiss	5M	0	No	0,157	2,027	Negativo
90	Maxima Mamani Yucra	152	Rosy	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,073	-7,701	Negativo
91	Maxima Mamani Yucra	153	Yola	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	No	0,075	-7,470	Negativo
92	Juana Achahui Chillihuani	154	Zaida	Hembra	Brown Swiss	10M	0	No	0,133	-0,753	Negativo
93	Juana Achahui Chillihuani	155	Florcita	Hembra	Brown Swiss	9M	0	No	0,072	-7,817	Negativo
94	Juana Achahui Chillihuani	156	Yola	Hembra	Brown Swiss	1A 8M	0	No	0,056	-9,670	Negativo
95	Juana Achahui Chillihuani	157	Flora	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,06	-9,207	Negativo
96	Justina Mayo Luna	158	Ana	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,075	-7,470	Negativo
97	Justina Mayo Luna	159	Dora	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,062	-8,975	Negativo
98	Justina Mayo Luna	160	Meka	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,071	-7,933	Negativo
99	Simon Crispin Turpo	161	Nikol	Hembra	Brown Swiss	1A 9M	0	No	0,07	-8,049	Negativo
100	Simon Crispin Turpo	162	Yesenia	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,059	-9,323	Negativo
101	Maria Virginia Yapura Lianos	163	Susan	Hembra	Brown Swiss	4M	2	No	0,063	-8,859	Negativo
102	Victor Quispe	164	Lucy Flor	Hembra	Brown Swiss	1A 6M	0	No	0,076	-7,354	Negativo
103	Victor Quispe	165	Lucy Flor	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,057	-9,554	Negativo
104	Victor Quispe	166	Chaska	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,083	-6,543	Negativo
105	Simon Crispin Turpo	167	Jhasmin	Hembra	Brown Swiss	1A 8M	0	No	0,094	-5,269	Negativo
106	Simon Crispin Turpo	168	Rosa	Hembra	Brown Swiss	1A 8M	0	No	0,117	-2,606	Negativo
107	Simon Crispin Turpo	169	Gloria	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,061	-9,091	Negativo
108	Simon Crispin Turpo	170	Raquel	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,068	-8,280	Negativo
109	Lorenzo Chillihuani	171	Maruja	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,066	-8,512	Negativo
110	Lorenzo Chillihuani	172	Carmen	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,059	-9,323	Negativo
111	Florentino Quispe Turpo	173	Rosa	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	No	0,093	-5,385	Negativo
112	Florentino Quispe Turpo	174	Pucala	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	2	No	0,067	-8,396	Negativo

113	Florentino Quispe Turpo	175	Flor	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,092	-5,501	Negativo
114	Florentino Quispe Turpo	176	Domingo	Macho	Brown Swiss	6 ^a	0	No	0,056	-9,670	Negativo
115	Florentino Quispe Turpo	177	Pucala Mama	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	6	No	0,058	-9,438	Negativo
116	Cirila Merma Choque	178	Colorada	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,081	-6,775	Negativo
117	Cirila Merma Choque	179	Mestiza	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	2	No	0,064	-8,743	Negativo
118	Cirila Merma Choque	180	Paloma	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	Si	0,092	-5,501	Negativo
119	Cirila Merma Choque	181	Merino Cunca	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	No	0,069	-8,164	Negativo
120	Cirila Merma Choque	182	Carmencita	Hembra	Brown Swiss	1A 2M	0	No	0,144	0,521	Negativo
121	Romulo Corimanya Merma	183	Rosy	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,059	-9,323	Negativo
122	Romulo Corimanya Merma	184	Maca	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,07	-8,049	Negativo
123	Mario Huanca Apaza	185	Adela	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	5	Si	0,073	-7,701	Negativo
124	Mario Huanca Apaza	186	Gabriela	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,068	-8,280	Negativo
125	Mario Huanca Apaza	187	Naranjita	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	Si	0,076	-7,354	Negativo
126	Mario Huanca Apaza	188	Katy	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	0	No	0,08	-6,891	Negativo
127	Mario Huanca Apaza	189	Buch	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,088	-5,964	Negativo
128	Mario Huanca Apaza	190	Jersey	Macho	Brown Swiss	7M	0	No	0,072	-7,817	Negativo
129	Gabina Yucra Crispin	191	Flora	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,052	-10,13	Negativo
130	Gabina Yucra Crispin	192	Analy	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,167	6,53	Negativo
131	Gabina Yucra Crispin	193	Rosa	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,596	50,31	Positivo
132	Gabina Yucra Crispin	194	Florella	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,127	2,45	Negativo
133	Gabina Yucra Crispin	195	Clebert	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,081	-2,24	Negativo
134	Gabina Yucra Crispin	196	Celia	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,167	6,53	Negativo
135	Gabina Yucra Crispin	197	Sabino	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,596	0,216	Negativo

136	Florencia Condori de Mendoza	198	Pucala	Hembra	Criollo	8ª	6	No	0,127	1,616	Negativo
137	Florencia Condori de Mendoza	199	Martha	Hembra	Brown Swiss	1ª	0	No	0,055	0,323	Negativo
138	Florencia Condori de Mendoza	200	Blanca	Hembra	Criollo	6ª	2	No	0,091	4,203	Negativo
139	Florencia Condori de Mendoza	201	Tturpa	Hembra	Brown Swiss	6ª	2	No	0,074	2,371	Negativo
140	Florencia Condori de Mendoza	202	Misita	Hembra	Criollo	7ª	3	No	0,061	0,970	Negativo
141	Florencia Condori de Mendoza	203	Chaska	Hembra	Criollo	8M	0	No	0,082	3,233	Negativo
142	Florencia Condori de Mendoza	204	Cria de Misita	Hembra	Criollo	7M	0	No	0,048	-0,216	Negativo
143	Florencia Condori de Mendoza	205	Carla	Hembra	Brown Swiss	7M	0	No	0,047	1,401	Negativo
144	Florencia Condori de Mendoza	206	Yanatico	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,115	1,078	Negativo
145	Jose Sallo Paucar	207	Pamela	Hembra	Brown Swiss	6ª	2	Si	0,059	-4,49	Negativo
146	Jose Sallo Paucar	208	Cria de Pucala	Macho	Brown Swiss	6M	0	No	0,498	40,31	Positivo
147	Jose Sallo Paucar	209	Lourdes	Hembra	Brown Swiss	6ª	3	Si	0,075	-2,85	Negativo
148	Jose Sallo Paucar	210	Nely	Hembra	Brown Swiss	7ª	4	Si	0,046	0,000	Negativo
149	Jose Sallo Paucar	211	Flora	Hembra	Brown Swiss	6ª	2	Si	0,064	-0,323	Negativo
150	Jose Sallo Paucar	212	Ana	Hembra	Brown Swiss	5ª	2	No	0,05	-0,431	Negativo
151	Jose Sallo Paucar	213	Cinthia	Hembra	Brown Swiss	7ª	4	Si	0,065	-0,539	Negativo
152	Jose Sallo Paucar	214	Arturo	Macho	Brown Swiss	1ª	0	No	0,062	6,789	Negativo
153	Jose Sallo Paucar	215	Roque	Macho	Brown Swiss	1A 6M	0	No	0,059	9,483	Negativo
154	Jose Sallo Paucar	216	Hijo de Ana	Macho	Brown Swiss	1A 7M	0	No	0,401	5,819	Negativo

155	Jose Sallo Paucar	217	Hijo de Cintia	Macho	Brown Swiss	1A 5M	0	No	0,075	0,000	Negativo
156	Jose Sallo Paucar	218	Mire	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	0	Si	0,052	-0,647	Negativo
157	Jose Sallo Paucar	219	Eliana	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	Si	0,049	1,293	Negativo
158	Jose Sallo Paucar	220	Dora	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	Si	0,067	1,616	Negativo
159	Felix Mayo	221	Sumi	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,07	1,940	Negativo
160	Felix Mayo	222	Pelusa	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	Si	0,053	0,108	Negativo
161	Felix Mayo	223	Dina	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	Si	0,047	-0,539	Negativo
162	Felix Mayo	224	Calve	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	5	Si	0,062	1,078	Negativo
163	Felix Mayo	225	Susan	Hembra	Brown Swiss	1A 5M	0	Si	0,056	0,431	Negativo
164	Felix Mayo	226	Reyna	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	Si	0,053	0,108	Negativo
165	Glicerio Turpo Merma	227	Olinda	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	Si	0,05	-0,216	Negativo
166	Glicerio Turpo Merma	228	Holstin	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,091	4,203	Negativo
167	Glicerio Turpo Merma	229	Naranja	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	No	0,073	2,263	Negativo
168	Glicerio Turpo Merma	230	Zonali	Hembra	Brown Swiss	4A 5M	2	No	0,066	1,509	Negativo
169	Glicerio Turpo Merma	231	Rita	Hembra	Brown Swiss	4A 5M	2	No	0,142	9,698	Negativo
170	Glicerio Turpo Merma	232	Esumeo	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	Si	0,064	1,293	Negativo
171	Justina Merma Gonzalo	233	Carel	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	Si	0,057	0,539	Negativo
172	Justina Merma Gonzalo	234	Linda	Hembra	Brown Swiss	10M	0	Si	0,046	-0,647	Negativo
173	Justina Merma Gonzalo	235	Melody	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,053	0,108	Negativo
174	Justina Merma Gonzalo	236	Cheyyla	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,06	0,862	Negativo
175	Justina Merma Gonzalo	237	Totita	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	5	Si	0,05	-0,216	Negativo
176	Justina Merma Gonzalo	238	Mery	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	Si	0,074	2,371	Negativo
177	Justina Merma Gonzalo	239	Dina	Hembra	Brown Swiss	6M	4	Si	0,078	2,802	Negativo

178	Teofilo Fuentes Gonzalo	240	Gringa	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	6	No	0,054	0,216	Negativo
179	Teofilo Fuentes Gonzalo	241	Uva	Hembra	Brown Swiss	10M	0	No	0,095	4,634	Negativo
180	Teofilo Fuentes Gonzalo	242	Nana	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,046	-0,647	Negativo
181	Teofilo Fuentes Gonzalo	243	Reta	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,059	0,754	Negativo
182	Teofilo Fuentes Gonzalo	244	Milusca	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,067	1,616	Negativo
183	Teofilo Fuentes Gonzalo	245	Dina	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,078	2,802	Negativo
184	Eduardo Merma Choquehuayta	246	Yuli	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,054	0,216	Negativo
185	Eduardo Merma Choquehuayta	247	Gabriela	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	No	0,051	-0,108	Negativo
186	Reynaldo Choquehuayta Huanca	248	Lupe	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,054	0,216	Negativo
187	Reynaldo Choquehuayta Huanca	249	Dina	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,079	2,909	Negativo
188	Reynaldo Choquehuayta Huanca	250	Luna	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,064	1,293	Negativo
189	Elizabeth Condori Chillihuani	251	Vicky	Hembra	Brown Swiss	1A 4M	0	Si	0,059	0,754	Negativo
190	Elizabeth Condori Chillihuani	252	Azumi	Hembra	Brown Swiss	1A 8M	0	Si	0,053	0,108	Negativo
191	Elizabeth Condori Chillihuani	253	Kuda	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	Si	0,056	0,431	Negativo
192	Elizabeth Condori Chillihuani	254	Retama	Hembra	Brown Swiss	2A 8M	0	Si	0,078	2,802	Negativo
193	Elizabeth Condori Chillihuani	255	Sanson	Macho	Brown Swiss	10M	0	No	0,053	0,108	Negativo
194	Elizabeth Condori Chillihuani	256	Kayla	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	Si	0,051	-0,108	Negativo
195	Elizabeth Condori Chillihuani	257	Merlyn	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	Si	0,051	-0,108	Negativo
196	Elizabeth Condori Chillihuani	258	Burra	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	4	No	0,054	0,216	Negativo
197	Elizabeth Condori Chillihuani	259	Jasy	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	2	No	0,094	4,526	Negativo
198	Elizabeth Condori Chillihuani	260	Breta	Hembra	Brown Swiss	2A 1M	1	Si	0,076	2,586	Negativo

199	Elizabeth Condori Chillihuani	261	Giani	Hembra	Brown Swiss	6ª	1	No	0,063	1,185	Negativo
200	Victoria Quispe Choque	262	Luisa	Hembra	Brown Swiss	7A 3M	3	No	0,061	0,970	Negativo
201	Victoria Quispe Choque	263	Negra	Hembra	Brown Swiss	6ª	4	No	0,053	0,108	Negativo
202	Donato Ccorimanya	264	Pucca Mama	Hembra	Brown Swiss	3ª	1	No	0,07	1,940	Negativo
203	Donato Ccorimanya	265	Palpacha	Hembra	Brown Swiss	3ª	1	No	0,148	10,345	Negativo
204	Donato Ccorimanya	266	Bronses	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,133	8,728	Negativo
205	Donato Ccorimanya	267	Manuelito	Macho	Brown Swiss	1ª	0	No	0,052	0,000	Negativo

Anexo 6. Registro de Vacunos y resultados a la prueba de ELISA para Leucosis Bovina, comunidad de Lauramarca

Nº	Nombre del Productor	Nº Muestra	Nombre/ Vacuno	Sexo	Raza	Edad	Nº Partos	Participa en Ferias	Densidad Optica	M/N%	Diagnostico
1	Juana S.P	268	Lucila	Hembra	Brown Swiss	6ª	4	No	0,072	2,155	Negativo
2	Seferino Yana	269	Chaska	Hembra	Brown Swiss	6ª	5	No	0,08	3,017	Negativo
3	Dominga Quispe	270	Asunta	Hembra	Brown Swiss	11M	0	No	0,056	0,431	Negativo
4	Bonifacio Luna Crispin	271	Dora	Hembra	Brown Swiss	9ª	4	No	0,056	0,431	Negativo
5	Bonifacio Luna Crispin	272	Karen	Hembra	Brown Swiss	1ª	0	No	0,069	1,832	Negativo
6	Bonifacio Luna Crispin	273	Celia	Hembra	Brown Swiss	9ª	5	No	0,121	7,435	Negativo
7	Bonifacio Luna Crispin	274	Rosa	Hembra	Brown Swiss	2ª	1	SI	0,063	1,185	Negativo
8	Benito Roca Huanca	275	Negra	Hembra	Holstein	12ª	8	No	0,145	10,022	Negativo
9	Benito Roca Huanca	276	Damiana	Hembra	Brown Swiss	1A6M	0	No	0,191	14,978	Negativo
10	Benito Roca Huanca	277	Negra P.	Hembra	Holstein	1ª	0	No	0,065	1,401	Negativo

11	Benito Roca Huanca	278	Sarita (cria)	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,082	3,233	Negativo
12	Benito Roca Huanca	279	Vilma	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	2	No	0,058	0,647	Negativo
13	Benito Roca Huanca	280	Sarita	Hembra	Brown Swiss	12 ^a	10	No	0,063	1,185	Negativo
14	Benito Roca Huanca	281	Cria Vilma	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,073	2,263	Negativo
15	Benito Roca Huanca	282	Sanson	Macho	Brown Swiss	1A6M	0	No	0,059	0,754	Negativo
16	Benito Roca Huanca	283	Hijo de Negra	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,077	2,694	Negativo
17	Florencia Andrade Ccolque	284	Lasy	Hembra	Brown Swiss	4A 6M	0	No	0,049	-0,363	Negativo
18	Florencia Andrade Ccolque	285	Susana	Hembra	Brown Swiss	9 ^a	4	No	0,073	2,123	Negativo
19	Mario Quispe Huanca	286	Chaska	Hembra	Brown Swiss	1A 2M	0	No	0,048	-0,466	Negativo
20	Mario Quispe Huanca	287	Isabela	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,051	-0,155	Negativo
21	Mario Quispe Huanca	288	Chabela	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,053	0,052	Negativo
22	Mario Quispe Huanca	289	Andre	Macho	Brown Swiss	1A 3M	0	No	0,06	0,777	Negativo
23	Sonia Yucra Apaza	290	Anita	Hembra	Hibrido	8 ^a	6	No	0,048	-0,466	Negativo
24	Sonia Yucra Apaza	291	Yola	Hembra	Hibrido	4 ^a	2	No	0,062	0,984	Negativo
25	Sonia Yucra Apaza	292	Rosa	Hembra	Hibrido	8M	0	No	0,059	0,673	Negativo
26	Sonia Yucra Apaza	293	Simon	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,054	0,155	Negativo
27	Benigna Guzman Yapura	294	Rumina	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,044	-0,880	Negativo
28	Victoria Garcia Yara	295	Leon	Macho	Brown Swiss	9M	0	No	0,089	3,780	Negativo
29	Cirilo Chillihuani Yucra	296	Chara	Hembra	Brown Swiss	9M	0	No	0,05	-0,259	Negativo
30	Marcelino Chillihuani Yucra	297	Yeni	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,087	3,573	Negativo
31	Marcelino Chillihuani Yucra	298	Juana	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,05	-0,259	Negativo
32	Marcelino Chillihuani Yucra	299	Flor	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	5	No	0,071	1,916	Negativo
33	Marcelino Chillihuani Yucra	300	Chaska	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	2	No	0,053	0,052	Negativo
34	Marcelino Chillihuani Yucra	301	Karina	Hembra	Brown Swiss	11M	0	No	0,049	-0,363	Negativo
35	Marcelino Chillihuani Yucra	302	Grimaldo	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,043	-0,984	Negativo

36	Marcelino Chillihuani Yucra	303	Dina	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	0	No	0,049	-0,363	Negativo
37	Marcelino Chillihuani Yucra	304	Reina	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,061	0,880	Negativo
38	Marcelino Chillihuani Yucra	305	Ruth	Hembra	Brown Swiss	1A 10M	0	No	0,051	-0,155	Negativo
39	Marcelino Chillihuani Yucra	306	Chamaco	Macho	Brown Swiss	6M	0	No	0,068	1,605	Negativo
40	Marcelino Chillihuani Yucra	307	Olimpico	Macho	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,058	0,570	Negativo
41	Marcelino Chillihuani Yucra	308	Lara	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,053	0,052	Negativo
42	Enriqueta Machaca Huilca	309	Yeni	Hembra	Brown Swiss	1A 7M	0	Si	0,051	-0,155	Negativo
43	Enriqueta Machaca Huilca	310	Naty	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,047	-0,570	Negativo
44	Enriqueta Machaca Huilca	311	Ccasa	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,108	5,748	Negativo
45	Enriqueta Machaca Huilca	312	Uрпи	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	Si	0,047	-0,570	Negativo
46	Enriqueta Machaca Huilca	313	Anderson	Macho	Brown Swiss	6M	0	No	0,051	-0,155	Negativo
47	Enriqueta Machaca Huilca	314	SN(Menor)	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,072	2,020	Negativo
48	Sonia Huanca Chillihuani	315	Huldere	Macho	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,062	0,984	Negativo
49	Ronal Luna Espitea	316	Chaska	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,053	0,052	Negativo
50	Ronal Luna Espitea	317	Ccasa	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	5	No	0,045	-0,777	Negativo
51	Ronal Luna Espitea	318	Yandy	Hembra	Hibrido	2A 4M	0	No	0,05	-0,259	Negativo
52	Feliciano Chillihuani Luna	319	Yoni	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,048	-0,466	Negativo
53	Juan Chillihuani Quispe	320	Katy	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,083	3,159	Negativo
54	Juan Chillihuani Quispe	321	Cachuda	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	4	No	0,05	-0,259	Negativo
55	Juan Chillihuani Quispe	322	Carmelita	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,051	-0,155	Negativo
56	Juan Chillihuani Quispe	323	Alan	Macho	Brown Swiss	1A 2M	0	No	0,053	-5,20	Negativo
57	Jacinta Huanca Chillihuani	324	Frisia	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,559	44,50	Positivo
58	Jacinta Huanca Chillihuani	325	Negra	Hembra	Hibrido	1A 2M	0	No	0,049	-5,59	Negativo
59	Jacinta Huanca Chillihuani	326	Basilia	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,049	-0,363	Negativo

60	Jacinta Huanca Chillihuani	327	Nilida	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,054	0,155	Negativo
61	Jacinta Huanca Chillihuani	328	Yeni	Hembra	Hibrido	8M	0	No	0,051	-0,155	Negativo
62	Jacinta Huanca Chillihuani	329	Cria de Basilia	Macho	Brown Swiss	5M	0	No	0,058	0,570	Negativo
63	Jacinta Huanca Chillihuani	330	Jhon	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,053	0,052	Negativo
64	Santiago Chillihuani	331	Carmelita	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	2	No	0,049	-0,363	Negativo
65	Santiago Chillihuani	332	Negrta	Hembra	Hibrido	4 ^a	1	No	0,055	0,259	Negativo
66	Santiago Chillihuani	333	Hijo de Carmelita	Macho	Hibrido	1A 3M	0	No	0,052	-0,052	Negativo
67	Santiago Chillihuani	334	Brown Cruzado	Hembra	Hibrido	3 ^a	1	No	0,062	0,984	Negativo
68	Santiago Chillihuani	335	Campeon	Macho	Hibrido	1A 3M	0	No	0,058	0,570	Negativo
69	Santiago Chillihuani	336	Negrto	Macho	Hibrido	2 ^a	0	No	0,081	2,952	Negativo
70	Santiago Chillihuani	337	Holstein	Hembra	Hibrido	6 ^a	4	No	0,086	3,470	Negativo
71	Santiago Chillihuani	338	Pachita	Hembra	Hibrido	3 ^a	1	No	0,057	0,466	Negativo
72	Santiago Chillihuani	339	Erika	Hembra	Hibrido	8M	0	No	0,056	0,363	Negativo
73	Fructuosa Ccolque Quispe	340	Zaida	Hembra	Hibrido	4 ^a	2	No	0,075	2,330	Negativo
74	Fructuosa Ccolque Quispe	341	Cria de Zaida	Hembra	Hibrido	7M	0	No	0,047	-0,570	Negativo
75	Fructuosa Ccolque Quispe	342	Yeni	Hembra	Criollo	4 ^a	1	No	0,048	-0,466	Negativo
76	Edwin Ccolque Puma	343	Dina	Hembra	Criollo	5 ^a	3	No	0,051	-0,155	Negativo
77	Edwin Ccolque Puma	344	Toro Gateado	Macho	Brown Swiss	1A6M	0	No	0,069	1,709	Negativo
78	Rene Samuel Lunamayo	345	Mery	Hembra	Brown Swiss	4A 5M	3	No	0,048	-0,466	Negativo
79	Rene Samuel Lunamayo	346	Soltera	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,089	3,780	Negativo
80	Rene Samuel Lunamayo	347	Sara	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	2	No	0,075	2,330	Negativo
81	Rene Samuel Lunamayo	348	Mensa	Hembra	Hibrido	10M	0	No	0,061	0,880	Negativo
82	Rafael Cuchayruni	349	Domitila	Hembra	Hibrido	3 ^a	1	No	0,049	-0,363	Negativo
83	Vilma Condori Florez	350	Negra	Hembra	Hibrido	7 ^a	5	No	0,051	-0,155	Negativo

84	Vilma Condori Florez	351	Ternera Bayo	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,053	0,052	Negativo
85	Anselma Fuentes Huallpa	352	Tika	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,06	0,777	Negativo
86	Anselma Fuentes Huallpa	353	Anca(M. de Yeni)	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,051	-0,155	Negativo
87	Ignacio Chillihuani Espitea	354	Chino	Macho	Brown Swiss	11M	0	No	0,068	1,605	Negativo
88	Ignacio Chillihuani Espitea	355	Cria de Bonilla	Macho	Brown Swiss	1A 1M	0	No	0,049	-0,363	Negativo
89	Ignacio Chillihuani Espitea	356	Ana	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,051	-0,155	Negativo
90	Ignacio Chillihuani Espitea	357	Yoni	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,16	11,134	Negativo
91	Ignacio Chillihuani Espitea	358	Janeth	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,057	0,466	Negativo
92	Ignacio Chillihuani Espitea	359	Negrita	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,056	0,363	Negativo
93	Ignacio Chillihuani Espitea	360	Brown Swiss	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	No	0,074	2,227	Negativo
94	Ignacio Chillihuani Espitea	361	Cria de Ana	Hembra	Brown Swiss	1A1M	0	No	0,065	1,295	Negativo
95	Ignacio Chillihuani Espitea	362	Bonilla	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	2	No	0,059	0,673	Negativo
96	Sabina Condori Quispe	363	Lucita	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	Si	0,073	2,123	Negativo
97	Sabina Condori Quispe	364	Bety	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	4	Si	0,071	1,916	Negativo
98	Sabina Condori Quispe	365	Azul	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	Si	0,048	-0,466	Negativo
99	Sabina Condori Quispe	366	Rubi	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,055	0,259	Negativo
100	Sabina Condori Quispe	367	Paloma	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	Si	0,065	1,295	Negativo
101	Sabina Condori Quispe	368	Dina	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,07	1,813	Negativo
102	Sabina Condori Quispe	369	Tula	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,051	-0,155	Negativo
103	Lourdes Mandura Chillihuani	370	Troton	Macho	Brown Swiss	6M	0	No	0,062	0,984	Negativo
104	Lourdes Mandura Chillihuani	371	Dina	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	4	No	0,094	4,298	Negativo
105	Lourdes Mandura Chillihuani	372	Deysi	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	2	No	0,065	-4,02	Negativo
106	Lourdes Mandura Chillihuani	373	Gladis	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,535	42,15	Positivo

107	Lourdes Mandura Chillihuani	374	Dino	Macho	Brown Swiss	6M	0	No	0,058	-4,71	Negativo
108	Lourdes Mandura Chillihuani	375	Juni	Hembra	Brown Swiss	7 ^a	1	No	0,073	2,123	Negativo
109	Tomasa Contreras Apaza	376	Julisa	Hembra	Brown Swiss	1A 3M	0	Si	0,403	56,51	Positivo
110	Maria Magdalena Quispe Tito	377	Simon	Macho	Brown Swiss	7M	0	Si	0,056	0,680	Negativo
111	Hilda Condori Quispe	378	Juli	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,094	8,058	Negativo
112	Hilda Condori Quispe	379	Vicky	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	6	No	0,052	-0,097	Negativo
113	Hilda Condori Quispe	380	Ana	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,081	5,534	Negativo
114	Hilda Condori Quispe	381	Jersi	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	No	0,053	0,097	Negativo
115	Maria Quispe Tito	382	Roxana	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	1	No	0,067	2,816	Negativo
116	Maria Quispe Tito	383	Kela	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,057	0,874	Negativo
117	Maria Quispe Tito	384	Hija de Roxana	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,066	2,621	Negativo
118	Lucia Gonzalo Hancoco	385	Atenea	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	1	Si	0,047	-1,068	Negativo
119	Lucia Gonzalo Hancoco	386	Koca	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	Si	0,082	5,728	Negativo
120	Lucia Gonzalo Hancoco	387	Melina	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	5	Si	0,104	10,000	Negativo
121	Lucia Gonzalo Hancoco	388	Eliana	Hembra	Brown Swiss	1A 5M	0	Si	0,049	-0,680	Negativo
122	Lucia Gonzalo Hancoco	389	Minerva	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	0	Si	0,057	0,874	Negativo
123	Lucia Gonzalo Hancoco	390	Yola	Hembra	Brown Swiss	8 ^a	4	Si	0,049	-0,680	Negativo
124	Lucia Gonzalo Hancoco	391	Cria de Yola	Macho	Brown Swiss	1 ^a	0	Si	0,05	-0,485	Negativo
125	Juliana Mamani Yucra	392	Micaela	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	3	Si	0,05	-0,485	Negativo
126	Juliana Mamani Yucra	393	Vegor	Hembra	Brown Swiss	6M	0	No	0,049	-0,680	Negativo
127	Juliana Mamani Yucra	394	Blanca	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	Si	0,052	-0,097	Negativo
128	Juliana Mamani Yucra	395	Piter	Hembra	Brown Swiss	9M	0	No	0,061	1,650	Negativo
129	Juliana Mamani Yucra	396	Rubi	Hembra	Brown Swiss	BLL	0	Si	0,052	-0,097	Negativo
130	Juliana Mamani Yucra	397	Kely	Hembra	Brown Swiss	1 ^a	0	No	0,053	0,097	Negativo

131	Bonifacio Merma Cruz	398	Tania	Hembra	Brown Swiss	1A 9M	0	No	0,051	-0,291	Negativo
132	Maria Cahuana Merma	399	Flor	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	4	No	0,047	-1,068	Negativo
133	Irma Huanca Huaya	400	Yacho	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	3	Si	0,045	-1,456	Negativo
134	Irma Huanca Huaya	401	Uchin	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	1	No	0,057	0,874	Negativo
135	Irma Huanca Huaya	402	Damaris	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	No	0,047	-1,068	Negativo
136	Irma Huanca Huaya	403	Yola	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	Si	0,063	2,039	Negativo
137	Irma Huanca Huaya	404	Changuiño	Hembra	Brown Swiss	8M	0	No	0,047	-1,068	Negativo
138	Irma Huanca Huaya	405	Paty	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,046	-1,262	Negativo
139	Irma Huanca Huaya	406	Katy	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,056	0,680	Negativo
140	Jose Sallo	407	Chaska	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,063	2,039	Negativo
141	Jose Sallo	408	Rosi	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	Si	0,045	-1,456	Negativo
142	Jose Sallo	409	Jersey	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	Si	0,052	-0,097	Negativo
143	Jose Sallo	410	Karina	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,059	1,262	Negativo
144	Jose Sallo	411	Muñeca	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,06	1,456	Negativo
145	Jose Sallo	412	Dina	Hembra	Brown Swiss	1A 7M	0	Si	0,043	-1,845	Negativo
146	Jose Sallo	413	Vaca Rosa	Hembra	Brown Swiss	6 ^a	0	Si	0,046	-1,262	Negativo
147	Maximo Huanca	414	Lola	Hembra	Brown Swiss	4 ^a	2	No	0,044	-1,650	Negativo
148	Mario Sallo	415	Cachasa	Hembra	Brown Swiss	5 ^a	2	Si	0,045	-1,456	Negativo
149	Mario Sallo	416	Vaca Doña	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	Si	0,047	-1,068	Negativo
150	Mario Sallo	417	Rosita	Hembra	Brown Swiss	3 ^a	1	Si	0,066	2,621	Negativo
151	Mario Sallo	418	Vaca Helen	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	Si	0,053	0,097	Negativo
152	Santos Merma	419	Karina	Hembra	Brown Swiss	2 ^a	0	No	0,045	-1,456	Negativo
153	Vicente Sallo	420	Nelda	Hembra	Brown Swiss	7M	0	No	0,374	51,40	Positivo

154	Vicente Sallo	421	Yuli	Hembra	Brown Swiss	5A	2	Si	0,046	-6,40	Negativo
155	Juliana Mamani Yucra	422	Micaela	Hembra	Brown Swiss	5A	3	Si	0,336	44,71	Positivo
156	Felix Mayo	423	Sumi	Hembra	Brown Swiss	4A	1	No	0,505	74,49	Positivo
157	Gabino Yucra Crispin	424	Sabino	Macho	Brown Swiss	8M	0	No	0,1	9,223	Negativo
158	Cayetano Luna Merma	59	Azul	Hembra	Brown Swiss	4A	1	No	0,048	-0,874	Negativo
159	Cayetano Luna Merma	72	Lucita	Hembra	Brown Swiss	3A	2	No	0,043	-1,845	Negativo
160	Cayetano Luna Merma	79	Tula	Hembra	Brown Swiss	5A	2	No	0,046	-1,262	Negativo
161	Cayetano Luna Merma	82	Bety	Hembra	Brown Swiss	4A	1	No	0,047	-1,068	Negativo
162	Cayetano Luna Merma	89	Cintia	Hembra	Brown Swiss	7M	0	No	0,05	-0,485	Negativo
163	Cayetano Luna Merma	92	Paloma	Hembra	Brown Swiss	4A	2	No	0,043	-1,845	Negativo
164	Cirila Chilihuanani Merma	88	Grisel	Hembra	Brown Swiss	4A 6M	5	No	0,832	132,11	Positivo
165	Cirila Chilihuanani Merma	94	Carolina	Hembra	Brown Swiss	9M	0	No	0,046	-6,40	Negativo
166	Florentina Yucra	63	Betucha	Macho	Brown Swiss	1A 3M	0	No	0,867	138,27	Positivo
167	Florentina Yucra	70	Yola	Hembra	Brown Swiss	1A 1M	0	No	0,043	-1,845	Negativo
168	Florentina Yucra	97	Dana	Hembra	Brown Swiss	2A	1	No	0,042	-2,039	Negativo

Anexo 7. Cálculos para determinar la prevalencia del LVB, en vacunos de la comunidad de Andamayo.

$$P = \frac{0}{55} \times 100$$

$$P = 0.00\%$$

Entonces:

$$p \pm z \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

$$0.00 \pm 1.89 \sqrt{\frac{0.00 \times 1}{55}}$$

$$0.00 \pm 1.89 \times 0.00$$

$$0.00 \pm 0.00$$

Anexo 8. Cálculos para determinar la prevalencia del LVB, en vacunos de la comunidad de Ccolcca.

$$P = \frac{C}{n} \times 100$$

$$P = \frac{2}{205} \times 100$$

$$P = 0.97 \%$$

Entonces:

$$IC = p \pm z \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

$$0.97 \pm 1.89 \sqrt{\frac{0.97 \times 0.99}{205}}$$

$$0.97 \pm 1.89 \times 0.068$$

$$0.97 \pm 0.13$$

Anexo 9. Cálculos para determinar la prevalencia del LVB, en vacunos de la comunidad de Lauramarca.

$$P = \frac{C}{n} \times 100$$

$$P = \frac{8}{168} \times 100$$

$$P = 2.79\%$$

Entonces:

$$IC = p \pm z \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

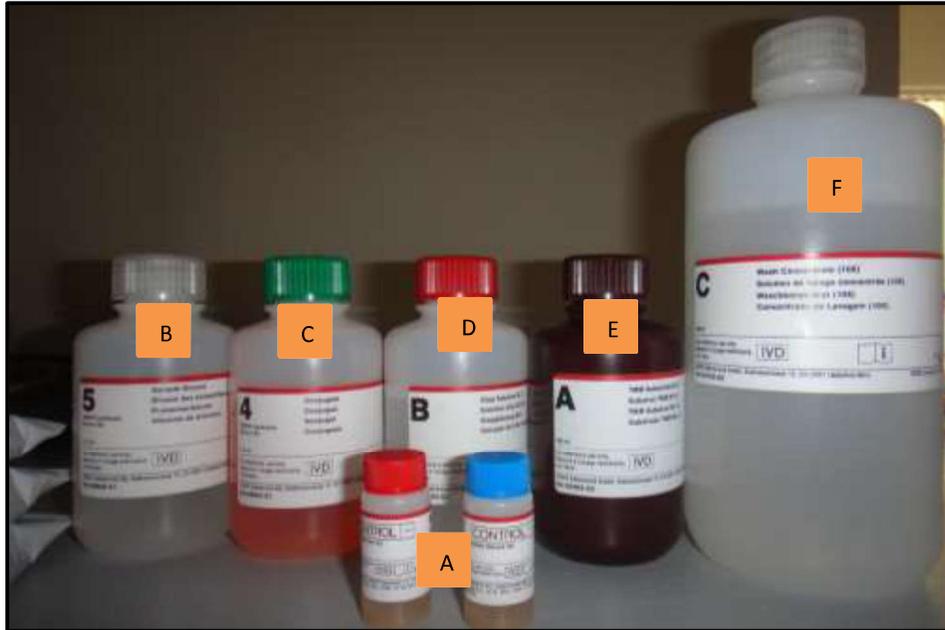
$$2.79 \pm 1.89 \sqrt{\frac{2.79 \times 0.97}{168}}$$

$$2.79 \pm 1.89 \times 0.13$$

$$2.79 \pm 0.24$$



Fotografía 6: Laboratorio de Análisis Serológico Animal



Fotografía 7: Kit para el diagnóstico de Leucosis Bovina

A. Controles +/- , B. Diluyente de la muestra, C. Conjugado, D. Solución de frenado, E. Substrato TMB n. °12, F. Solución de lavado concentrado (10X)

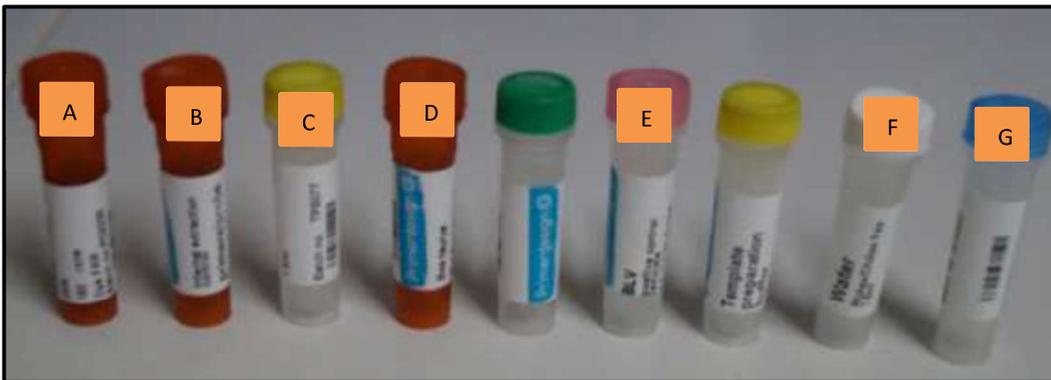


Fotografía 8: Laboratorio de Biología molecular y celular



Fotografía 9: Reactivos para la extracción de material genético

A. Wash solution 1, B. Wash solution 2, C. Lysis solution, D. Binding solution, E. Elution buffer, F. Magnetic beads, G. Proteinase K



Fotografía 10: Reactivos para la identificación del VLB

A. Mezcla de cebador/sonda específica BLV, B. Mezcla de cebador/sonda de control de extracción interno, C. Plantilla de tampón de preparación, D. Mezcla de cebador/ control endógeno, E. Plantilla de control positivo BLV, F. Agua libre de ARNasa/ADNasa, G. ARN control de extracción interno



Fotografía 11: Materiales para la extracción del material genético y detección del VLB

A. Lentes, B. Mandil descartable, C. gorro, D. Barbijo, E. Guantes de látex, F. Cabina de flujo laminar, G. Micro pipetas, H. Tips estériles, I. Multiportador de tubo para el vortex, J. Vortex, k. Rack magnético, L. Viales criogénicos

Anexo 10: Ficha de trabajo de campo

AREA DE SANIDAD ANIMAL

APELLIDOS Y NOMBRES:.....

PROVINCIA:..... DISTRITO..... COMUNIDAD:.....

FECHA:..... CELULAR:.....

REGISTRO DE VACUNOS:

Nº DE MUESTRA	NOMBRE DEL VACUNO	Nº DE ARETE	EDAD	RAZA	SEXO	Nº DE PARTOS	PARTICIPA EN FERIAS	OBSERV.